Методическое руководство по определению витаминов

МЕДГИЗ · 1960

18/V. 64
г. Оренбург
Данилов

18/V. 64 г.
г. Оренбург
Данский

ME
РУ
ПО ОПР
А,
И КАР
ПРЕ

Д

МЕТОДИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО

ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ ВИТАМИНОВ A, D, E, B_1, B_2, B_6, PP, C, P И КАРОТИНА В ВИТАМИННЫХ ПРЕПАРАТАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Под редакцией
действительного члена АМН СССР
проф. *Б. А. ЛАВРОВА*

ТРЕТЬЕ ИЗДАНИЕ

МЕДГИЗ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ИЗДАТЕЛЬСТВО
МЕДИЦИНСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ
МЕДГИЗ — 1960 — МОСКВА

СОДЕРЖАНИЕ

Определение витамина А. *З. С. Графская* 3
Определение витамина А в жирах рыб и млекопитающих (натуральных и витаминизированных) 8
Определение витамина А в высокоактивных концентратах 9
Определение витамина А в драже с витамином А и поливитамином 9
Определение витамина А в витаминизированных пищевых продуктах (конфеты, печенье, пряники и т. д.). 10
Определение витамина А в сливочном и топленом масле, а также в витаминизированных жирах (маргарин, лярд и растительные масла) 10
Определение витамина А в тканях, органах и т. п. . . . 11
Определение витамина А в яйцах 11
Определение витамина А в коровьем молоке 12
Определение витамина А в женском молоке 13
Определение витамина А прибором З. С. Графской . . . 13
Определение витамина А электрофотоколориметром ФЭК-М 16
Определение каротина (провитамина А). *З. С. Графская* 19
Определение каротина в свежем растительном материале (свежие травы, овощи, плоды и ягоды) 24
Определение каротина в сухом растительном материале . 27
Определение каротина в плодоовощных консервах . . . 27
Определение каротина в растительных соках 28
Определение каротина в масляных концентратах 28
Определение каротина в жирах и маслах 29
Определение каротина в коровьем молоке и каротиноидов в женском молоке 29
Определение каротина в кристаллических препаратах . . 29
Определение каротина колориметром Дюбоска 30
Определение каротина электрофотоколориметром или ступенчатым фотометром 31
Определение каротина прибором З. С. Графской . . 32
Определение витамина А и каротина в пищевых продуктах. *З. С. Графская* 34
Определение витамина А и каротина в готовых блюдах. *З. С. Графская* 37
Определение витамина А и каротина в первых блюдах 37
Определение витамина А и каротина во вторых блюдах 40
Определение витамина D_2 химическим методом. *З. С. Графская* 42
Определение витамина D_2 в высокоактивных спиртовых концентратах 43

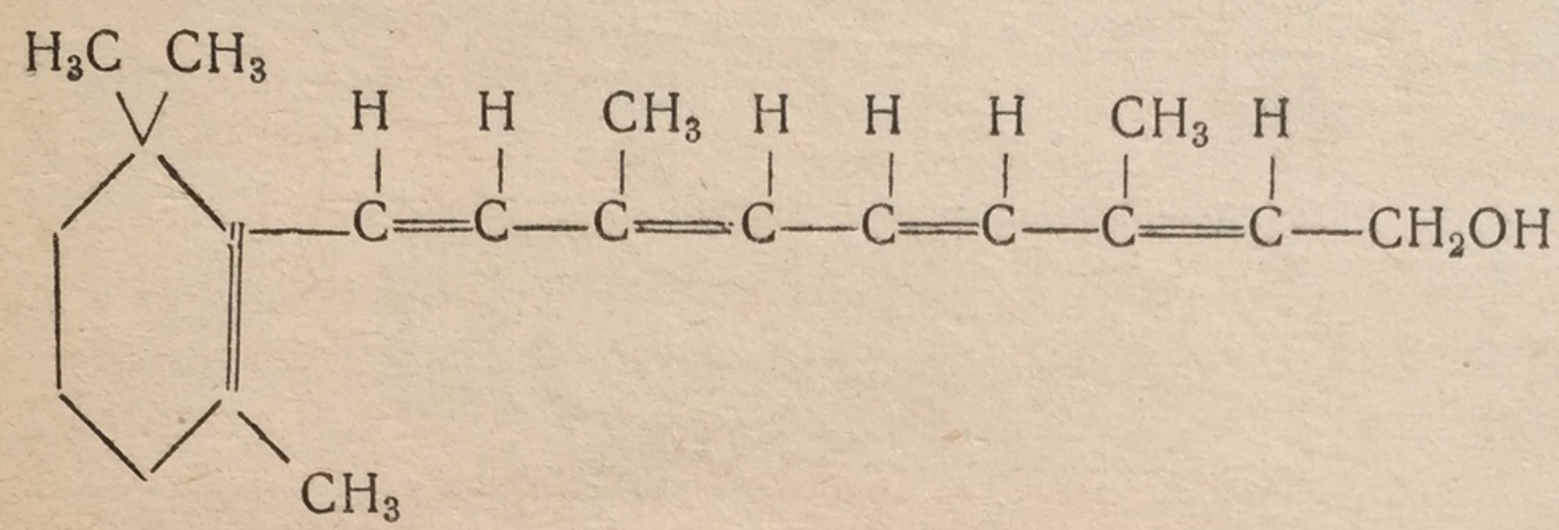
Определение витамина D_2 в масляных концентратах . 44
Определение витамина D_2 ступенчатым фотометром типа Пульфриха 45
Определение витамина D_2 электрофотоколориметром ФЭК-М 47
Определение витамина D_2 биологическим методом. *А. А. Лапина* 49
Определение витамина Е химическим методом. *З. С. Графская* 53
Определение витамина Е в спирто-сахарных и масляных препаратах 54
Определение витамина Е фотометром Пульфриха . 56
Тиохромный метод определения витамина B_1 (тиамина). *Е. И. Соловьева* 58
Флюорометрический метод определения тиамина в препаратах 62
Определение витамина B_1 в объектах, богатых связанной формой тиамина 65
Определение витамина B_1 в объектах, содержащих флуоресцирующие примеси 68
Флюороскопический метод определения тиамина в препаратах и пищевых продуктах 71
Методы определения витамина B_2 (рибофлавина). *В. П. Трофимович* 75
Флюорометрический метод определения рибофлавина в препаратах 75
Флюороскопический метод определения рибофлавина в препаратах 78
Колориметрический метод определения рибофлавина в кристаллическом препарате и драже с витамином B_2 . 81
Флюорометрический метод определения рибофлавина в пищевых продуктах и других объектах 84
Определение витамина B_6 (гидрохлоридпиридоксина) в чистых препаратах. *Н. А. Брюханова* 89
Анализ кристаллического препарата гидрохлоридпиридоксина 90
Анализ растворов гидрохлоридпиридоксина в ампулах 91
Методы определения витамина PP в препаратах. *В. П. Трофимович* 92
Объемный метод определения никотиновой кислоты в кристаллическом препарате, драже и таблетках . . . 92
Родан-бромидный метод определения никотиновой кислоты и никотинамида в кристаллическом препарате, драже и таблетках 95
Методы определения витамина С (аскорбиновой кислоты). *Н. С. Ярусова, В. А. Богданова, Н. Н. Березовская, Н. А. Брюханова, К. М. Тикоцкая, В. М. Селиванова* 99
Точный (арбитражный) метод определения аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом без применения сероводорода 101
Точный (арбитражный) метод определения аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом с применением сероводорода 114

Особенности анализа некоторых объектов при применении арбитражных методов 118
Упрощенный (контрольный) метод определения витамина С 122
Хлороформный (контрольный) метод определения витамина С 130
Йодатный (контрольный) метод определения витамина С 133
Йодатный метод определения синтетической аскорбиновой кислоты 136
Йодометрический метод определения синтетической аскорбиновой кислоты 138
Определение аскорбиновой кислоты в ее ампульных препаратах 140
Применимость различных методов определения витамина С в различных объектах 143
Методы определения витамина Р. *К. М. Тикоцкая, Н. Н. Березовская* 146
Определение витамина Р (катехинов) в препаратах из чайного листа 146
Определение витамина Р (рутина) в чистых препаратах 151

Приложения 154

Нормы суточного потребления витаминов 154
Постановление Всесоюзной государственной санитарной инспекции № 6 от 18/IV 1945 г. 156
Инструкция по проведению государственного витаминного контроля № 254 от 6/VIII 1957 г. 156
Приказ министра здравоохранения СССР № 209-м от 13/IX 1955 г. Об обязательной витаминизации питания в детских учреждениях, больницах (для детей и взрослых) и родильных домах 167
Инструкция по проведению С-витаминизации питания в больницах (для детей и взрослых), яслях, домах ребенка, детских санаториях и родильных домах 168

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А



Структурная формула витамина А

Принцип и применимость метода

Основной принцип предлагаемых ниже методов определения витамина А заключается в том, что этот витамин, содержащийся в препаратах и естественных источниках, извлекается из исследуемых объектов серным эфиром после омыления спиртовым раствором щелочи (КОН).

Выделяемая после удаления эфира неомыляемая фракция растворяется в хлороформе, в котором производится количественное определение витамина А по реакции с треххлористой сурьмой в присутствии уксусного ангидрида.

Ниже приводится описание особенностей определения витамина А в жирах, маслах, препаратах с витамином А, высокоактивных концентратах, витаминизированных кондитерских изделиях и молоке. Определение витамина А в объектах, содержащих одновременно каротин и витамин А, приведено в разделе «Определение каротина».

Аппаратура

1. Прибор, предложенный З. С. Графской (рис. 1). Прибор для определения содержания витамина А состоит из следующих частей: а) штатива с подвижной шкалой, отверстиями для пробирок-эталонов и отверстием в неподвижной части прибора для

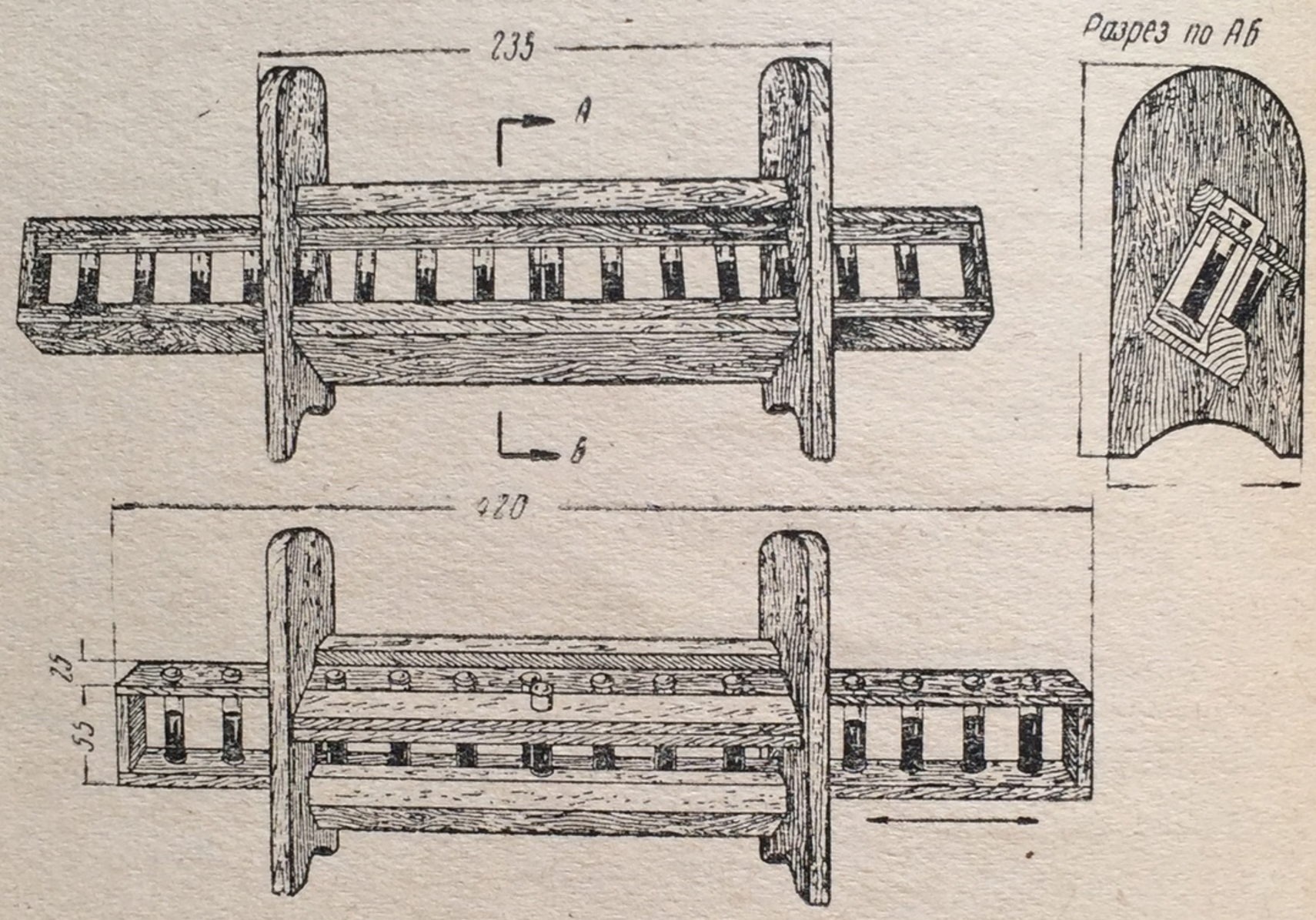


Рис. 1. Прибор с пробирками для определения витамина А, предложенный З. С. Графской.

пробирки с испытуемым раствором (длина подвижной шкалы с эталонами — 420 мм, ширина — 25 мм, высота — 55 мм); б) 15 закрытых пробками с прокладками из пергаментной бумаги и залитых менделеевской замазкой пробирок-эталонов из бесцветного стекла, содержащих окрашенные растворы, составленные из смеси сернокислой меди и азотнокислого кобальта (высота пробирок-эталонов — 60 мм, ширина — 10 мм).

К прибору приложен набор склянок, содержащих запасные растворы для эталонов.

2. Электрофотоколориметр. Удобнее пользоваться моделью, имеющей дифференциальную схему, и электрофотоколориметром ФЭК-М с компенсационной схемой.

Посуда

1. Бюретка с притертым краном на 10—15 мл для приливания треххлористой сурьмы.
2. Пипетка на 2 или на 1 мл с делениями до 0,1 мл для отмеривания испытуемого раствора.
3. Колбы Вюрца.
4. Делительные воронки.
5. Колбы конические.
6. Воздушные холодильники (стеклянные трубки длиной 60 см и диаметром 1,2 см).
7. Бюксы.
8. Воронки для фильтрования.
9. Мерные колбы на 10—500 мл.
10. Эксикаторы.
11. Склянки Тищенко.
12. Холодильники Либиха.
13. Дрексели.
14. Колбы Бунзена.

Реактивы

1. Калий едкий х. ч.[1].
2. Натрий едкий х. ч.
3. Натрий сернокислый кристаллический или безводный х. ч.
4. Кислота серная х. ч.
5. Ангидрид уксусный ч. д. а.[2].
6. Кобальт азотнокислый ч. д. а.
7. Медь сернокислая ч. д. а.
8. Железо сернокислое закисное х. ч.
9. Калий марганцовокислый х. ч.
10. Спирт этиловый (ректификат).
11. Хлороформ ч. д. а.
12. Сурьма треххлористая.
13. Эфир этиловый (серный) или наркозный.
14. Калий йодистый х. ч.
15. Бензидин — основание.
16. Спирт этиловый (ректификат).
17. Спирт этиловый, очищенный перегонкой над NaOH (применяется при анализе молока и определении витаминов D и E).

---

[1] х. ч. — химически чистый.
[2] ч. д. а. — чистый для анализа.

Испытание реактивов на чистоту, их очистка и приготовление растворов

Хлороформ х. ч. а. Проба на присутствие свободного хлора. 10 мл хлороформа взбалтывают с 40 мл воды. Водный слой отделяют, затем к 10 мл водного слоя прибавляют 0,5 мл бесцветного раствора йодистого калия и 0,5 мл крахмала. В присутствии свободного хлора водный слой окрашивается в синий цвет.

Проба на присутствие фосгена и соляной кислоты. Несколько кристалликов бензидина растворяют в 10 мл испытуемого препарата в сухой колбочке или склянке с притертой пробкой и оставляют на сутки в темном месте. При наличии фосгена и соляной кислоты раствор становится мутным.

Очистка хлороформа. Продажный хлороформ для удаления спирта, который прибавляют к нему для консервации, и соляной кислоты, которая может образоваться в результате гидролиза, промывают 4—5 раз дистиллированной водой (в соотношении 2 : 1) и высушивают безводным или прокаленным сернокислым натрием в течение суток. Высушенный хлороформ фильтруют и перегоняют, отбирая фракцию, кипящую в пределах от 61 до 62°.

Перегнанный хлороформ хранят в темной склянке с притертой пробкой.

Серный эфир х. ч. Проба на присутствие перекисей. К 20 мл эфира приливают 5 мл смеси, состоящей из равных объемов 50% раствора KJ и 1% спиртового раствора фенолфталеина, и встряхивают. Образование красной окраски указывает на присутствие перекисей.

Освобождение эфира от перекисей. *Первый способ.* К 500 мл эфира приливают 25 мл 10% раствора $FeSO_4$ и 25 мл 5% раствора KOH. Реакционную смесь периодически взбалтывают в течение 30 минут, затем переносят в делительную воронку. После того как отделится нижний водный слой бурой жидкости, эфир промывают дистиллированной водой и сушат безводным или прокаленным сернокислым натрием в течение суток. Затем эфир профильтровывают, отгоняют в темную сухую склянку, закрывают корковой пробкой и хранят в прохладном месте.

Второй способ. К 500 мл эфира приливают 50 мл 4% раствора $KMnO_4$ и 5 мл 40% водного раствора NaOH или KOH. Реакционную смесь помещают в делительную воронку, несколько раз взбалтывают, затем эфирному слою дают отстояться и отделяют от него водный слой. Если проба на присутствие перекисей оказывается положительной, эту операцию повторяют 2—3 раза. Освобожденный от перекисей эфир промывают водой, сушат над безводным или прокаленным сернокислым натрием в течение суток, профильтровывают и перегоняют в сухую темную склянку. Эфир хранят в прохладном темном месте.

Примечание. Наркозный эфир как не содержащий перекисей обработке не подлежит.

Раствор треххлористой сурьмы. Очистка продажного реактива. Продажный препарат треххлористой сурьмы промывают небольшими количествами очищенного хлороформа до тех пор, пока не будет стекать совершенно прозрачный раствор. Отмытую от гидрата окиси сурьму переносят в эксикатор и высушивают над серной кислотой (удельный вес 1,84) в течение 2—3 суток.

Приготовление насыщенного раствора. Из очищенной треххлористой сурьмы и очищенного сухого хлороформа готовят насыщенный раствор, содержащий при температуре 20° 23% сурьмы.

Этиловый спирт-ректификат (освобождение от альдегидов). Этиловый спирт перегоняют над твердым химически чистым NaOH (10 г на 1 л спирта). Перегнанный спирт применяется при омылении молока и при определении витаминов D и E.

Подготовка материала к анализу

При исследовании жидкостей (рыбьи жиры, растворы А-витаминных препаратов в масле, витаминизированные растительные масла) склянки, содержащие исследуемый объект, несколько раз тщательно встряхивают. Пробу (навеску) для анализа берут пипеткой или наливают осторожно по стеклянной палочке в колбочку и затем взвешивают на аналитических весах.

При исследовании витаминного драже или таблеток отбирают пробы в количестве 30—50 штук, взвешивают их и определяют вес одной штуки. Затем драже растирают в фарфоровой ступке и перемешивают. Из приготовленной пробы берут навески для анализа и переносят растертую массу через вороночку с отрезанным концом в заранее взвешенную на аналитических весах колбочку.

При исследовании кондитерских изделий (конфеты, пряники, печенье и т. д.) берут пробу не менее 200 г (в зависимости от количества введенного витамина А). Определяют вес одной штуки. Затем всю пробу измельчают, растирая в фарфоровой ступке. Навеску для анализа взвешивают в колбочке.

Сливочное и топленое масла, а также витаминизированный маргарин и лярд для средней пробы берут в количестве не менее 200 г. Пробу расплавляют (до полужидкого состояния) в химическом стаканчике на водяной бане при постепенном перемешивании стеклянной палочкой или фарфоровым шпателем. Из расплавленного жира берут навеску для анализа, наливая его по стеклянной палочке в колбочку, затем дают остыть и взвешивают.

При исследовании тканей и органов берут не менее 50 г материала. Мелкие органы (весом 50 г) берут целиком. Мягкие ткани или органы (печень) измельчают сначала ножницами, затем растирают в фарфоровой ступке до состояния однородной кашицы. Твердые ткани (мышечные) также измельчают сначала ножницами, а затем в мясорубке и тщательно перемешивают. Из полученной однородной массы берут навеску и взвешивают в колбочке на аналитических весах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ЖИРАХ РЫБ И МЛЕКОПИТАЮЩИХ (НАТУРАЛЬНЫХ И ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ)

Навеску натурального или витаминизированного рыбьего жира, взятую в количестве от 0,5 до 1 г (в зависимости от предполагаемой А-витаминной активности исследуемого объекта), омыляют 10 мл 0,5 N спиртового раствора КОН в течение часа на водяной бане при 85—90° в колбочке, снабженной воздушным холодильником. При омылении препаратов витамина А в жире (полу-

фабрикатах) количество щелочи (на навеску 0,5—1 г) увеличивают до 15 мл. Омыление проводят в течение часа.

Омыленный раствор разбавляют 20 мл воды, а неомыляемую фракцию экстрагируют в делительной воронке серным эфиром (свободным от перекисей) трижды: первый раз — 50 мл, второй и третий раз — по 25 мл эфира.

Соединенные эфирные вытяжки в делительной воронке промывают 3—4 раза дистиллированной водой (по 20 мл) до нейтральной реакции промывных вод на лакмус.

Промытую эфирную вытяжку высушивают над обезвоженным сернокислым натрием, для чего к эфирной вытяжке добавляют 7—8 г сернокислого натрия и оставляют на 30 минут, периодически взбалтывая. После этого вытяжку фильтруют и отгоняют эфир в токе углекислоты. Сухой остаток растворяется в хлороформе.

Раствор доводят до определенного объема, добавляя раствор треххлористой сурьмы, и колориметрируют.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ВЫСОКОАКТИВНЫХ КОНЦЕНТРАТАХ

Определение витамина А в высокоактивных концентратах (100 000 ИЕ в 1 г и выше), подвергнутых молекулярной дистилляции, можно проводить без омыления.

Навеску высокоактивного концентрата, взятую в количестве около 0,22 г, растворяют сначала в 25 мл хлороформа, а затем делают дополнительное разведение с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось от 30 до 50 ИЕ витамина А. Содержание витамина в конечном объеме устанавливается колориметрированием.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ДРАЖЕ С ВИТАМИНОМ А И ПОЛИВИТАМИНОМ

Из растертой в ступке однородной массы драже на анализ берут навеску в количестве около 1 г и взвешивают в колбочке на аналитических весах. Омыление проводят в течение часа 15 мл 0,5 N раствора спиртовой щелочи (КОН) на водяной бане при температуре 95° с воздушным холодильником.

Омыленный раствор охлаждают и разбавляют 30 мл воды (двойным объемом по отношению к взятому на анализ спирту). Неомыляемую фракцию извлекают серным эфиром трижды: первый раз — 50 мл, второй и третий раз — по 25 мл. Дальнейший ход анализа тот же, что и при определении витамина А в жирах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ (КОНФЕТЫ, ПЕЧЕНЬЕ, ПРЯНИКИ И Т. Д.)

Из заранее измельченной навески витаминизированных изделий весом от 20 до 50 г (в зависимости от предполагаемой А-витаминной активности) троекратно экстрагируют витамин А серным эфиром холодным способом. На каждую экстракцию (в зависимости от навески) берут от 20 до 50 мл эфира. Эфирные вытяжки фильтруют, соединяют вместе и эфир отгоняют в токе углекислого газа. Остаток после удаления эфира омыляют в течение часа на водяной бане 15 мл 0,5 N спиртового раствора КОН. После охлаждения к омыляемому раствору добавляют 30 мл воды и проводят извлечение серным эфиром в виде трех последовательных экстракций, для которых берут 50, 25 и 25 мл серного эфира. Дальнейший ход анализа такой же, как и при определении витамина А в жирах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В СЛИВОЧНОМ И ТОПЛЕНОМ МАСЛЕ, А ТАКЖЕ В ВИТАМИНИЗИРОВАННЫХ ЖИРАХ (МАРГАРИН, ЛЯРД И РАСТИТЕЛЬНЫЕ МАСЛА)

Натуральное сливочное и коровье масло берут на анализ в количестве от 10 до 20 г. Навеска витаминизированных жиров зависит от того количества препарата витамина А, которое было введено в жир при его витаминизации. Если навеска была взята в количестве 10 г, то на омыление достаточно взять 20 мл 20% спиртового раствора КОН[1]. При увеличении навески до 20 г количество щелочи увеличивают до 30 мл. Омыление про-

[1] 20% спиртовой раствор КОН лучше готовить в день анализа, так как при стоянии он может пожелтеть. Раствор щелочи можно хранить до 2 недель, если поместить его в холодильник.

водят в течение часа на водяной бане с воздушным холодильником.

После омыления раствор разбавляют 60 мл воды (если щелочь была взята в количестве 30 мл) и проводят извлечение неомыляемой фракции серным эфиром, причем на первую экстракцию берут 75 мл, а на три последующие — по 25 мл эфира.

Дальнейшая обработка эфирных экстракций и колориметрирование проводят так же, как при определении витамина А в жирах.

Методика определения каротина в масле приводится в разделе определения каротина.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ТКАНЯХ, ОРГАНАХ И Т. П.

От средней пробы измельченного органа берут навеску около 3 г и к ней добавляют 1 мл 60% водного раствора едкого кали, 10—20 мл 96° спирта-ректификата и нагревают в течение 2 часов на водяной бане при 80—85° с обратным холодильником до полного растворения ткани. В том случае, если ткань не растворяется полностью, добавляют еще 10—20 мл спирта.

После омыления к раствору приливают двойное количество воды (по отношению к спирту). Дальнейшую обработку раствора ведут тем же способом, как при омылении жира.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ЯЙЦАХ

Витамин А определяется в желтке яйца, но содержание витамина рассчитывают обычно на вес целого яйца. Поэтому до начала определения взвешивают 10 штук яиц и устанавливают средний вес одного яйца, затем яйца разбивают (осторожно отделяют желтки от белков), взвешивают и определяют вес одного желтка.

Пробу на анализ отбирают в количестве 18—20 г из предварительно смешанных (без взбалтывания) 10 желтков и взвешивают в колбочке, в которую пробу переносят с помощью стеклянной воронки.

Омыление навески желтка производится 6 мл 60% водного раствора КОН и 20 мл спирта на водяной бане с воздушным холодильником в течение 2 часов. Пос-

ле омыления к охлажденному раствору добавляют еще 10 мл спирта и 60 мл воды и производят извлечение неомыляемой фракции эфиром. Экстракцию серным эфиром и обработку эфирных вытяжек производят так же, как при определении витамина А в жире.

Остаток после удаления эфира растворяется в хлороформе. Определение витамина А проводится колориметрически.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ

Определение витамина А в молоке можно проводить, омыляя пробы при нагревании на кипящей водяной бане (первый способ) или в термостате при температуре 25—35° (второй способ). При втором способе омыления (в более мягких условиях) синее окрашивание, образующееся при реакции витамина А с треххлористой сурьмой, более устойчиво. Это имеет существенное значение при определении небольших количеств витамина А в небольших объемах молока, тем более что образующаяся окраска раствора быстро исчезает. Метод также более удобен при проведении серийных определений, так как одновременно можно омылять большое количество проб молока.

Параллельные пробы на анализ отбирают только после тщательного перемешивания всего объема молока в течение 3 минут с помощью особой мешалки, состоящей из алюминиевого кружочка (с маленькими отверстиями), прикрепленного к стержню.

Первый способ. 100 мл коровьего молока омыляют спиртовым раствором КОН, при этом на каждую пробу берут 100 мл 96% спирта, 10 мл воды и 20 г КОН. Омыление проводят на кипящей водяной бане с воздушным холодильником в течение 2 часов. После охлаждения пробы производится извлечение неомыляемой фракции: первый раз — 75 мл, второй и третий — по 40 мл серного эфира. Соединенные эфирные вытяжки промывают 4 раза водой, сушат безводным сернокислым натрием, который затем отфильтровывают. После удаления растворителя (серного эфира в токе CO_2) остаток растворяют в 2—5 мл хлороформа и проводят определение витамина А или визуальным способом по серии стандартных растворов, или в фотоэлектроколориметре.

Второй способ. 100 мл молока омыляют 10 мл 60% водного раствора KOH и 20 мл 96% этилового спирта (перегнанного над NaOH) в течение 72 часов в термостате при температуре 25—35°. В течение первого дня омыления реакционную жидкость в колбочке периодически взбалтывают. После того как омыление будет закончено и реакционная жидкость станет однородной, приступают к извлечению неомыляемой фракции серным эфиром. Начиная с этой стадии анализа дальнейшее определение проводят по прописи первого метода.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А В ЖЕНСКОМ МОЛОКЕ

Из средней пробы молока на каждое определение отбирают пипеткой 25 мл в колбочку, емкостью 50 мл. Затем наливают 3 мл водного раствора 60% KOH и 5—6 мл 96% этилового спирта (перегнанного над твердым NaOH). Пробу закрывают пробкой и ставят в термостат на 72 часа, температуру в котором поддерживают в пределах 25—35°. Во время омыления реакционную жидкость периодически взбалтывают. Омыленный раствор переносят количественно в делительную воронку емкостью 100 мл, в которой затем проводят извлечение неомыляемой фракции тремя порциями эфира — один раз 50 мл и два последующих раза по 25 мл эфира. Эфирные вытяжки, соединенные вместе, промывают водой до исчезновения следов щелочи, затем эфирный экстракт сушат сернокислым натрием. Высушенный эфирный раствор неомыляемой фракции фильтруют, а эфир отгоняют в токе CO_2. Сначала отгонка производится из колбочки емкостью 50 мл, а под конец — из пробирки, имеющей объем 5—6 мл и диаметр 1,5 мм. Остаток после удаления эфира растворяют в 3 мл хлороформа и проводят колориметрическое определение количества витамина А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А ПРИБОРОМ З. С. ГРАФСКОЙ

Приготовление стандартных растворов. Применяемые в приборе стандартные растворы готовят из 500 мл основного раствора, содержащего 75 г химически чистой сернокислой меди (воздушно-сухой) и 3,5 г химически чистого азотнокислого кобальта, просушенного в течение

2 суток в эксикаторе над серной кислотой и сохраняемого в бюксе в этом же эксикаторе.

Интенсивность окраски основного раствора соответствует 9,2 синих единиц.

Приготовление стандартных растворов производится по табл. 1.

Таблица 1

Таблица для приготовления стандартных растворов

№ пробирки	Количество основного раствора в мл	Количество воды в мл	Число синих единиц
1	20	0,4	9,0
2	20	1,6	8,5
3	20	3,0	8,0
4	20	4,5	7,5
5	20	6,3	7,0
6	20	8,7	6,5
7	20	11,6	6,0
8	20	14,6	5,5
9	20	19,0	5,0
10	20	24,4	4,5
11	20	31,6	4,0
12	20	41,2	3,5
13	20	55,4	3,0
14	20	74,2	2,5
15	20	104,2	2,0
16	20	131	1,75
17	20	175	1,5
18	20	190	1,25
19	20	240	1
20	20	330	0,75
21	Дистиллированная вода		

Для объектов, содержащих мало витамина А (например, молоко), пользуются серией пробирок с № 16 по № 21, а для остальных объектов — серией пробирок с № 1 по № 15.

Примечание. Окраска эталонов (с № 1 по № 15) не изменяется при хранении в течение полугода. Слабо окрашенные эталоны (№ 16—20) должны сменяться через 2—3 месяца.

Определение витамина А в исследуемом растворе. Для удобства и быстроты колориметрирования можно воспользоваться простым приборчиком, в котором пробирка с исследуемым раствором фиксирована неподвиж-

но, а пробирки со стандартными растворами находятся на подвижной шкале (описание прибора и приготовление стандартных растворов см. на стр. 4).

Хлороформный раствор неомыляемой фракции, содержащий витамин А, отмеривают точно в количестве 0,3 мл в пробирку прибора, туда же прибавляют 1—2 капли уксусного ангидрида (для предупреждения образования мути) и 3 мл раствора треххлористой сурьмы [1].

Определение интенсивности синего окрашивания производят через 5—10 секунд после прибавления к исследуемому раствору треххлористой сурьмы.

Пробирки со стандартными растворами подводят последовательно к пробирке к испытуемым раствором простым передвиганием шкалы. Прибор помещают на белой бумаге. Определение считается законченным, когда установлено совпадение окраски испытуемой пробирки с окраской одной из пробирок стандартного раствора.

Содержание витамина А в испытуемом растворе будет соответствовать тому числу синих единиц, которое обозначено на пробирке-эталоне, наиболее совпадающей по окраске с испытуемым раствором. Если окраска испытуемой жидкости лежит между окрасками двух сравниваемых подряд пробирок-эталонов, берут среднее из значений синих единиц, указанных на этих пробирках.

При колориметрировании раствора наиболее точные результаты получаются при определении в пределах от 3 до 6 синих единиц. Поэтому более концентрированные растворы необходимо разбавить и произвести определение повторно. Точность метода ±10%.

Вычисление содержания витамина А. Содержание витамина А в интернациональных единицах на 1 г исследуемого вещества вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot 2{,}5 \cdot V}{g \cdot 0{,}3}, \qquad (1)$$

где x — содержание витамина А в интернациональных единицах на 1 г исследуемого вещества; a — количество синих единиц, установленное при колориметрировании;

[1] Объем раствора, который берется для проведения реакции, может быть больше или меньше, но необходимо всегда сохранять определенное соотношение между количеством исследуемого раствора и треххлористой сурьмой (1 : 10).

g — навеска в граммах; V — объем хлороформного раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений); 2,5 — коэффициент пересчета синих единиц в гаммы витамина А[1]; 0,3 — коэффициент перевода числа гамм витамина А в интернациональные единицы.

Содержание витамина А в гаммах на 1 г исследуемого вещества вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot 2{,}5 \cdot V}{g}, \qquad (2)$$

где x — содержание витамина А в гаммах на 1 г исследуемого вещества; остальные обозначения те же, что и в формуле (1).

При вычислении содержания витамина А в гаммах на 100 мл молока применяется формула:

$$x = \frac{a \cdot 2{,}5 \cdot V \cdot 100}{g}, \qquad (3)$$

где x — содержание витамина А в гаммах на 100 мл молока; g — количество молока, взятое на определение в миллилитрах; 100 — коэффициент пересчета на 100 мл молока; остальные обозначения те же, что и в формуле (1).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А ЭЛЕКТРОФОТОКОЛОРИМЕТРОМ ФЭК-М

Для количественного определения витамина А по реакции с треххлористой сурьмой с помощью электрофотоколориметра удобнее пользоваться моделью, имеющей дифференциальную схему. Эти приборы позволяют производить отсчеты достаточно быстро.

Допускается пользоваться электрофотоколориметром с компенсационной схемой, каковым является прибор ФЭК-М. В последнем случае можно рекомендовать наливать раствор треххлористой сурьмы в заранее постав-

---

[1] Коэффициент 2,5 получился после сокращения двух коэффициентов: $\frac{20}{1000}$ и 125, имеющих следующее значение: $\frac{20}{1000}$ — коэффициент пересчета условных синих единиц в единицы CLO (единицы рыбьего жира), в которых ранее выражалась А-витаминная активность рыбьих жиров; 125 — коэффициент пересчета единиц CLO в гаммы витамина А, так как 1 CLO соответствует 125 γ витамина А.

ленную в прибор кювету через воронку с оттянутым концом, чтобы ускорить процесс измерения. Отсчет нужно производить через 10 секунд после приливания треххлористой сурьмы к исследуемому раствору, содержащему витамин А.

Калибрование электрофотоколориметра. Электрофотоколориметр калибруют с помощью стандартных хлороформных растворов витамина А. Лучшим препаратом для этой цели является кристаллический эфир витамина А. Можно применять стандартизированный высокоактивный концентрат витамина А в рыбьем жире.

Если такой концентрат содержит 100 000 ИЕ витамина А в 1 г, то для приготовления первоначального раствора берут навеску 0,5 г и растворяют в 50 мл хлороформа. Затем делают дальнейшее разведение: 2,5 мл полученного раствора переносят пипеткой в колбочку на 25 мл и доводят хлороформом до метки.

При этом разведении в 1 мл второго раствора будет содержаться 100 ИЕ витамина А. Из этого раствора готовят еще пять-шесть новых разведений с меньшим содержанием витамина А, в пределах от 20 до 70 ИЕ в 1 мл.

В приготовленных растворах измеряют интенсивность синей окраски, образующейся при взаимодействии витамина А с треххлористой сурьмой. Для этого применяют красный светофильтр, имеющий максимум пропускания при 620 mμ. Затем по оси ординат наносят найденные значения экстинкции для каждого раствора, а по оси абсцисс — содержание витамина А в этих же растворах, выраженное в интернациональных единицах на 1 мл. Соединяя точки пересечения величин экстинкции и концентрации стандартных растворов, вычерчивают калибровочный график.

Определение витамина А[1]. Концентрацию витамина А в конечном хлороформном растворе подбирают таким образом, чтобы величина найденной экстинкции укладывалась в пределах ранее составленного графика. Определив в приборе экстинкцию исследуемого раствора, находят по графику соответствующее ей содержание витамина А в интернациональных единицах 1 мл. По кон-

---

[1] Техника определения в приборе ФЭК-М приведена в разделе «Определение витамина D».

центрации витамина А в стандартном растворе (учитывая объем и разведение исследуемого раствора, а также навеску вещества, взятого на определение) находят содержание витамина А. Количество витамина А, содержащееся в разных объектах, может выражаться в следующих единицах: в интернациональных на 1 г вещества; в гаммах или миллиграммах на 1 г и на 100 г вещества.

Вычисление содержания витамина А. Содержание витамина А в интернациональных единицах на 1 г вещества вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot V}{g}, \qquad (4)$$

где x — содержание витамина А на 1 г исследуемого вещества в интернациональных единицах; a — количество витамина А в 1 мл исследуемого раствора (отсчитывается по графику); g — навеска вещества в граммах; V — объем исследуемого раствора в миллилитрах с учетом всех его разведений.

Содержание витамина А в гаммах на 1 г вещества вычисляют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 0{,}3}{g}, \qquad (5)$$

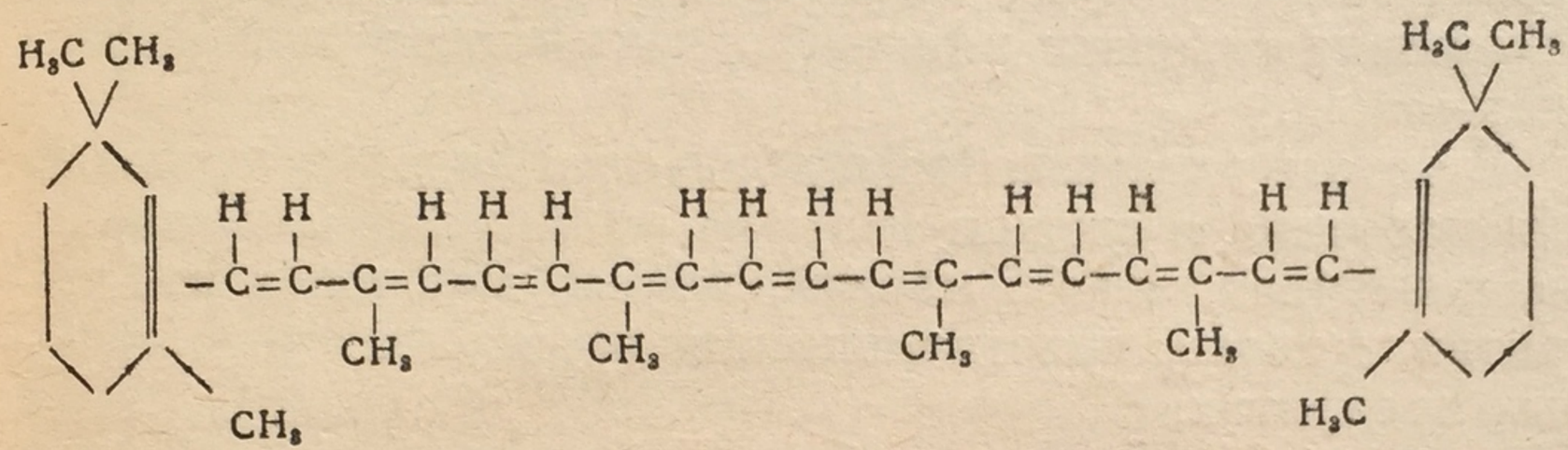
где x — содержание витамина А в гаммах на 1 г исследуемого вещества; 0,3 — коэффициент пересчета интернациональных единиц в гаммы витамина А; остальные обозначения те же, что и в формуле (4).

Содержание витамина А в гаммах на 100 г вещества вычисляют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 0{,}3 \cdot 100}{g}, \qquad (6)$$

где x — содержание витамина А в гамма-процентах; 100 — коэффициент пересчета на гамма-проценты; остальные обозначения те же, что и в формулах (4) и (5).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА (ПРОВИТАМИНА А)



Структурная формула β-каротина

Принцип и применимость метода

Каротин извлекают петролейным эфиром или бензином. Полученный экстракт освобождают при помощи адсорбции от посторонних красящих веществ. После этого производят количественное определение каротина по свойственной ему желтой окраске.

Ниже приводятся три варианта метода определения каротина.

При применении первого варианта каротин вместе с другими окрашенными пигментами извлекают из обезвоженного спиртом растительного материала бензином или петролейным эфиром, затем производят омыление перешедших в экстракт веществ спиртовым раствором щелочи и повторное извлечение каротина и других пигментов с применением тех же растворителей.

Вторично полученный экстракт освобождают при помощи адсорбции от сопутствующих красящих веществ и в фильтрате (прошедшем через адсорбент) определяют содержание каротина по свойственной ему желтой окраске.

Из сухого растительного материала каротин извлекают бензином или петролейным эфиром без обезвоживания.

При применении второго варианта каротин извлекают бензином или нейтролейным эфиром из биологических объектов растительного или животного происхождения только после их гидролиза спиртовым раствором КОН. В полученном экстракте после адсорбции мешающих определению пигментов содержание каротина устанавливается по интенсивности его окраски.

Третий вариант метода отличается от первого только тем, что в нем исключено омыление веществ, переходящих в бензин или петролейный эфир при первой экстракции.

В тексте указываются особенности способа определения каротина в свежем и сухом растительном материале, консервах, соках, маслах, жирах, масляных концентратах, молоке, кристаллических препаратах и в пищевых продуктах.

Аппаратура

1. Прибор Дюбоска.
2. Электрофотоколориметр.
3. Ступенчатый фотометр.
4. Прибор, предложенный З. С. Графской.

Посуда

1. Колбы Вюрца.
2. Колбы конические или плоскодонные.
3. Воздушные холодильники (стеклянные трубки длиной 60 см и диаметром 1,2 см).
4. Холодильники типа Либиха.
5. Ступки фарфоровые.
6. Бюксы.
7. Тигли фарфоровые.
8. Эксикаторы.
9. Воронки делительные.
10. Мерные колбы емкостью от 10 до 500 мл.
11. Мерные цилиндры.
12. Колбы Бунзена.
13. Склянки Тищенко.
14. Адсорбционная (стеклянная) колонка.
15. Пипетки мерные с делениями до 0,1 мл.

Реактивы и приготовления растворов

1. Калий едкий.
2. Натрий сернокислый безводный или прокаленный.
3. Аммоний сернокислый х. ч. или алюмокалиевые квасцы х. ч.
4. Окись магния (адсорбент).
5. Азобензол ч. д. а.
6. Этиловый спирт-ректификат.
7. Бихромат калия ч. д. а.
8. Петролейный эфир (температура кипения 55—70°) или бензин (температура кипения 70—80°) [1].
9. Хлороформ х. ч. [2].
10. Треххлористая сурьма х. ч.
11. Измельченное чистое стекло или песок.

Речной песок промывают 1% раствором HCl, затем водой до нейтральной реакции на лакмус и сушат или прокаливают.

12. Стандартный раствор азобензола.

14,5 мг кристаллического химически чистого азобензола растворяют в 100 мл 96° этилового спирта. 1 мл такого раствора по окраске соответствует 0,00235 мг каротина в 1 мл.

13. Стандартный раствор бихромата калия.

360 мг трижды перекристаллизованного бихромата калия растворяют в 1 л воды. 1 мл такого раствора соответствует 0,00208 мг каротина в 1 мл.

Стандартизация адсорбента окиси магния и техника хроматографирования с применением адсорбционной колонки

Для стандартизации адсорбента определяют адсорбционные свойства продажной химически чистой окиси магния и в соответствии с полученными данными производят обработку препарата.

Адсорбент непригоден для анализа, если при пропускании через него бензинового раствора каротина поте-

---

[1] Можно пользоваться при извлечении каротина фракцией бензина, перегоняющейся в пределах от 80 до 110°, однако в этом случае сгущение экстрактов надо проводить на песчаной бане.

[2] Способ проверки этого реактива на чистоту, а также очистка его изложены в главе «Определение витамина А».

ря последнего превышает 15%, а также в том случае, если адсорбент при промывании его бензином плохо задерживает ликопин, который должен адсорбироваться в виде розового кольца.

Изменения адсорбционных качеств продажного адсорбента производят для того, чтобы он удовлетворял указанным выше требованиям. Для этого его или увлажняют, понижая способность задерживать каротин, или, наоборот, высушивают при 100—105°, повышая этим его адсорбционные свойства по отношению к ликопину.

Увлажнение адсорбента проводят в эксикаторе над водой. Влажность адсорбента проверяют путем его высушивания в сушильном шкафу при 105° до постоянного веса.

Адсорбент следует хранить в стеклянной банке, а пробка должна быть залита парафином.

Способ определения процента потери каротина при адсорбции. Навеску кристаллического каротина 0,05 г растворяют в 50 мл бензина. Путем последовательного разведения этого раствора получают бензиновый раствор, содержащий приблизительно 0,01 мг каротина в 1 мл. 3—5 мл этого раствора пропускают через колонку с адсорбентом. В прошедшем через колонку растворе (*а*) определяют колориметрированием каротин. Затем раствор пропускают вторично через колонку, наполненную свежим адсорбентом, и снова определяют каротин в прошедшем через колонку растворе (*б*).

Потерю каротина при адсорбции вычисляют по разности между содержанием каротина в растворах *а* и *б*.

Примечание. При расчете результатов анализа следует принимать во внимание процент потери каротина, который дает применяемый адсорбент.

Способ определения ликопинзадерживающей способности адсорбента. В наполненную адсорбентом колонку наливают 1 мл раствора ликопина в бензине. Раствор ликопина должен по окраске приближаться к раствору азобензола, полученного путем растворения 145 мг кристаллического азобензола в 10 мл 96° спирта.

При промывании колонки бензином на ней должно оставаться прочно удерживающееся розовое кольцо. Затем в колонку вносят 2 мл бензинового раствора каротина, содержащего приблизительно 0,01—0,005 мг каро-

тина в 1 мл. При промывании колонки бензином каротин должен проходить через нее, не увлекая за собой розового ликопинового кольца.

Получение ликопина. Получают бензиновый экстракт ликопина из свежих или консервированных томатов таким же способом, как указано при определении каротина в свежем растительном материале (стр. 24—26). Затем бензиновый экстракт пропускают через адсорбционную колонку, наполненную стандартизированной окисью магния. Колонку промывают бензином до тех пор, пока проходящий через нее бензин не перестанет окрашиваться. После этого вводят через верхнее отверстие колонки шпатель, извлекают часть адсорбента, содержащего розовое кольцо. Розовый пигмент (ликопин) из адсорбента извлекают бензином с примесью 3% спирта. Из бензинового экстракта спирт отмывают водой, а остаток влаги удаляют с помощью сернокислого натрия так же, как и при просушивании бензиновых экстрактов каротина.

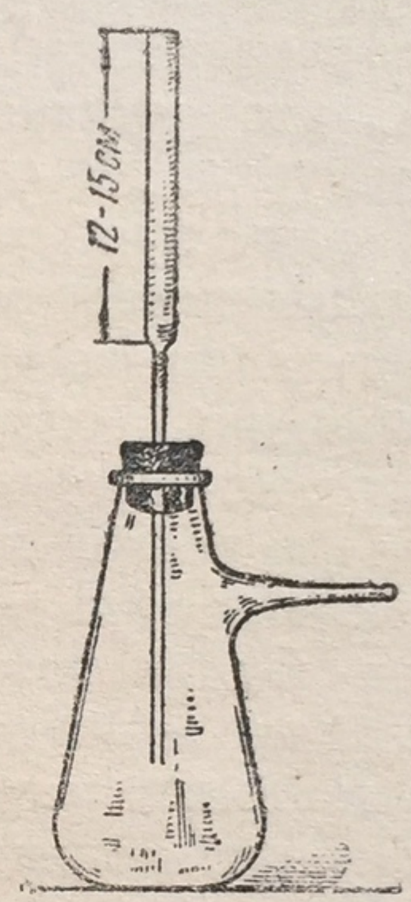


Рис. 2. Адсорбционная колонка.

Техника хроматографирования с применением адсорбционной колонки. Адсорбционная колонка (рис. 2) представляет собой суженную внизу стеклянную трубку длиной 12—15 см и диаметром 1—1,5 см. Эту трубку вставляют в резиновую пробку, предварительно подобранную к колбе Бунзена. Последняя при помощи резиновой трубки соединяется с предохранительной склянкой, которая в свою очередь соединяется с водоструйным насосом или с насосом Камовского для создания вакуума. В нижней части адсорбционной колонки помещают небольшой слой ваты.

Для наполнения адсорбционной колонки приготовляют кашицу из адсорбента и бензина или петролейного эфира. Этой кашицей заполняют колонку на 4—6 см и промывают небольшими порциями бензина или петролейного эфира. Необходимо при этом избегать образования пузырьков воздуха между кашицей и стенками труб-

ки и следить за тем, чтобы перед началом и во время адсорбции верхний слой кашицы был покрыт небольшим слоем бензина или петролейного эфира во избежание прохождения воздуха в адсорбирующую массу.

Подготовка материала к анализу

При исследовании свежего растительного материала берут среднюю пробу в количестве не менее 50 г. Шпинат, салат, зеленый лук, ботву овощей, кормовые травы измельчают сначала ножницами, затем пропускают через мясорубку. Полученную массу перемешивают и из нее отбирают пробу на анализ. Овощи и некоторые фрукты, как, например, морковь и яблоки, нарезают ножом и пропускают через мясорубку. Мягкие плоды (абрикосы, мандарины) сначала также нарезают ножом, а затем растирают в ступке. Ягоды прямо растирают в ступке.

При исследовании сухих овощей и плодов, а также кормовых трав среднюю пробу берут в количестве около 20 г. Сухие овощи и плоды измельчают на кофейной мельнице и добавочно растирают в ступке. Травы сначала нарезают ножницами, после чего пропускают через кофейную мельницу.

Плодоовощные консервы растирают в ступке, для чего все содержимое банки переносят в ступку.

Растительные соки, содержащиеся в стеклянном, плотно закрытом сосуде, перемешивают взбалтыванием и переворачиванием этого сосуда. На анализ отбирают цилиндром 100 мл сока.

При исследовании жиров, масел, препаратов каротина в масле и т. п. поступают так же, как и при определении витамина А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В СВЕЖЕМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ (СВЕЖИЕ ТРАВЫ, ОВОЩИ, ПЛОДЫ И ЯГОДЫ)

Первый способ. Навеску для анализа берут из предварительно измельченной средней пробы в количестве от 5 до 25 г (в зависимости от предполагаемого содержания каротина) и растирают в фарфоровой ступке с небольшим количеством прокаленного и промытого песка или измельченного стекла. Растертый в ступке материал обрабатывают пяти-десятикратным по отношению к взятой навеске количеством спирта-ректификата.

После растирания материала со спиртом в ступку добавляют порциями 20—30 мл бензина или петролейного эфира. Смесь снова тщательно растирают, после чего экстракт фильтруют через бумажный фильтр (стараться не переносить осадка на фильтр). Экстрагирование петролейным эфиром или бензином повторяют до тех пор, пока последние порции экстракта не станут бесцветными.

Петролейный или бензиновый фильтрат переносят в делительную воронку. Туда же добавляют воду в количестве нескольких миллилитров до полного разделения слоев: верхний слой — бензиновый или петролейно-эфирный, нижний — спиртовой. Спиртовой слой сливают в другую делительную воронку и промывают 2 раза бензином или петролейным эфиром порциями по 10 мл. Петролейно-эфирные или бензиновые вытяжки присоединяют к основному раствору, переносят в колбу и подвергают сгущению до объема в 20—30 мл, для чего бензин отгоняют на водяной бане с холодильником Либиха. Далее к экстракту прибавляют равный объем 5% спиртовой калийной щелочи, после чего в течение 1 часа проводят омыление на водяной бане с воздушным или водяным обратным холодильником при температуре 80—85°. Омыленный раствор переносят в делительную воронку и туда же прибавляют несколько миллилитров воды для разделения слоев. Смесь взбалтывают и производят отделение петролейно-эфирного или бензинового слоя от спиртовой щелочи. Спиртовой слой в делительной воронке промывают 2 раза бензином или петролейным эфиром порциями по 10 мл и присоединяют к основному экстракту. Петролейно-эфирную вытяжку промывают 4—5 раз дистиллированной водой для полного удаления спирта.

Отмытый от спирта бензиновый или петролейно-эфирный экстракт сушат в колбочке обезвоженным сернокислым натрием при взбалтывании до исчезновения мутности экстракта. Высушенный экстракт фильтруют, отделяя сернокислый натрий, и сгущают до объема 5—10 мл.

Сгущенный экстракт пропускают при небольшом разряжении, создаваемом в колбе Бунзена, через адсорбционную колонку с окисью магния, взятой в количестве 2 г, элюируя каротин петролейным эфиром или бензином до тех пор, пока выходящая из колонки жидкость не станет бесцветной. При этом необходимо следить за тем, чтобы

в фильтрат не проходили другие пигменты, появляющиеся на адсорбенте в виде цветных колец. При промывании адсорбента растворителем скорость протекания жидкости не должна превышать 50—60 капель в минуту.

Прошедший через колонку раствор каротина доводят в мерной колбе до определенного объема петролейным эфиром или бензином и колориметрируют с помощью колориметра Дюбоска, сравнивая со стандартным раствором азобензола или бихромата калия. Можно также определить содержание каротина по интенсивности окраски его растворов, пользуясь ступенчатым фотометром или фотоэлектроколориметром.

Второй способ. Второй способ отличается от первого тем, что анализ начинают с омыления исследуемого объекта так же, как и при определении витамина А.

Навеску растительного материала, отобранную из измельченной средней пробы в количестве от 5 до 20 г, взвешивают в колбочке емкостью 100—150 мл и омыляют.

Взятую на анализ навеску можно дополнительно растереть в ступке с песком. В этом случае растертую массу вместе с песком количественно переносят в колбочку, ступку обмывают небольшим количеством спирта, который сливают туда же.

Омыление проводят 5% спиртовым раствором КОН, взятым в количестве 20—40 мл, на водяной бане с воздушным холодильником в течение 1 часа. По окончании омыления содержимое колбочки охлаждают и жидкую часть переносят в делительную воронку, куда приливают 40—50 мл петролейного эфира или бензина и 20—40 мл воды. После разделения слоев верхний (растворитель) сливают в колбочку, а нижний (спирто-водный раствор щелочи) еще несколько раз обрабатывают петролейным эфиром или бензином до получения бесцветной вытяжки.

Оставшийся в колбе после сливания жидкой части плотный остаток промывают несколько раз одним из вышеуказанных растворителей, которые присоединяют к экстракту, полученному при обработке омыленного раствора. После этого собранные вытяжки промывают водой до нейтральной реакции на лакмус, экстракт сушат обезвоженным сернокислым натрием. В дальнейшем анализ проводят по прописи первого способа.

Третий способ. Этот способ можно применять для определения каротина в тех сырых растительных объектах, в отношении которых установлено, что результат анализа совпадает с данными, полученными с помощью первого способа.

При этом способе определения совершенно исключается омыление, а все остальные стадии анализа те же, что и в первом способе метода. Петролейно-эфирные вытяжки, полученные при экстракции растительного материала, промывают водой, сушат над безводным сернокислым натрием, сгущают до небольшого объема и пропускают через колонку с адсорбентом. Дальше определение проводят по первому способу метода.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В СУХОМ РАСТИТЕЛЬНОМ МАТЕРИАЛЕ

Первый способ. При определении каротина в сухом растительном материале (овощи, плоды, ягоды и кормовые травы) навеску для анализа берут в количестве от 2 до 10 г. Каротин извлекают петролейным эфиром или бензином, но без предварительной обработки спиртом. Петролейно-эфирные или бензиновые экстракты, соединенные вместе, сгущают до объема 20—30 мл и омыляют спиртовым раствором КОН. Дальнейшее определение проводят, как указано в первом способе метода исследования каротина в свежих растительных объектах.

Второй способ. Навеску, взятую в количестве 2—10 г, взвешивают в конической колбочке, заливают 10—15 мл дистиллированной воды и в таком виде оставляют для набухания на 12—15 часов. По истечении этого времени избыток воды декантируют, к набухшей пробе приливают 20—30 мл 5% спиртового раствора щелочи (КОН) и проводят омыление.

Далее анализ проводят так же, как и при определении каротина в свежем растительном материале по второму способу.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В ПЛОДООВОЩНЫХ КОНСЕРВАХ

Сначала определяют вес консервированного продукта, затем переносят все содержимое банки в большую стеклянную коническую воронку, в которой находится сло-

женная вдвое марля, и дают жидкости стечь, слегка отжимая плотную массу. Затем определяют вес всей плотной части консервов, что необходимо для вычисления содержания каротина во всей банке. Отжатую плотную часть растирают в ступке до получения однородной массы, после чего берут навеску в количестве от 5 до 20 г, которую растирают в ступке с песком и там же обрабатывают сначала спиртом, а затем петролейным эфиром (или бензином).

Дальше определение проводят так же, как указано в прописи первого способа для свежих растительных объектов.

Можно определить каротин в консервах, проведя сначала омыление навески 5% спиртовым раствором КОН, как указано в прописи второго способа, применяемого при исследовании свежих растительных объектов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В РАСТИТЕЛЬНЫХ СОКАХ

Растительный сок в количестве 100—200 мл нагревают до 70—80°, прибавляют к нему (для коагуляции белков и каротиноидов) 20—40 мл 5% раствора алюмо-калиевых квасцов и оставляют на 24 часа при комнатной температуре. Образовавшийся осадок отделяют от жидкой части декантацией. Осадок обезвоживают спиртом, приливая его в количестве 5—10 мл. Затем извлекают каротин так же, как при анализе свежего растительного материала.

При хроматографировании в этом случае применяют адсорбционную трубку меньших размеров: длина 6—7 см, внутренний диаметр 0,6—0,7 см.

При исследовании сока цитрусовых растений перед осаждением следует разбавлять его в 5—6 раз.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В МАСЛЯНЫХ КОНЦЕНТРАТАХ

При определении каротина в масляных концентратах берут навеску в количестве 0,25—3 г (в зависимости от содержания его в препарате) и омыляют 10—15 мл 5% раствора калийной щелочи на водяной бане, нагретой до 85—90°, в течение 1 часа. Омыленный раствор охлажда

ют, переносят в делительную воронку и извлекают неомыляемую фракцию бензином или петролейным эфиром. Дальнейший ход анализа аналогичен определению каротина в растительных объектах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В ЖИРАХ И МАСЛАХ

Содержание каротина в натуральном или витаминизированном сливочном и топленом масле, а также в витаминизированном маргарине и лярде определяется по методике, описанной для определения витамина А. Однако извлечение неомыляемой фракции, содержащей каротин, удобнее проводить петролейным эфиром (или бензином), так как колориметрирование каротина проводится в этих растворителях. Если экстракция проводилась серным эфиром, то после удаления его в токе углекислоты остаток растворяют в бензине или петролейном эфире, а затем проводят колориметрирование, как указано ниже.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ И КАРОТИНОИДОВ В ЖЕНСКОМ МОЛОКЕ

В женском молоке собственно каротина содержится только 25—40% по отношению ко всей сумме каротиноидов. Поэтому без применения хроматографической адсорбции количественно определить каротин можно только в виде суммы каротиноидов.

При определении содержания каротина в коровьем и каротиноидов в женском молоке основные стадии анализа (омыление проб молока и извлечение неомыляемой фракции) проводятся так же, как и при определении витамина А.

Количественное содержание каротина или каротиноидов в неомыляемой фракции определяется колориметрически по одному из описанных ниже способов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА В КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ

Устанавливается процент содержания каротина хроматографической адсорбцией и определяется чистота кристаллического препарата по температуре его плавления.

Определение содержания каротина. Для анализа берут навеску кристаллического каротина не менее 100 мг и растворяют в петролейном эфире или бензине в мерной колбочке емкостью 250 мл. Растворение производят при легком подогревании на водяной бане. Из полученного раствора отбирают пипеткой 5 мл, которые затем подвергают хроматографической адсорбции, как указано выше (см. «Определение каротина в свежем растительном материале»).

Прошедший через адсорбент элюат переносят количественно в мерную колбочку на 100 мл и доводят петролейным эфиром или бензином до метки. После перемешивания содержимого колбочки из раствора пипеткой отбирают 5 мл в мерную колбочку на 50 мл, объем раствора в которой также доводят до метки. В последнем растворе определяют содержание каротина колориметрически.

Определение температуры плавления кристаллического каротина. Температуру плавления кристаллических препаратов каротина определяют в стеклянном приборчике, состоящем из колбы, в которую вставлена на корковой пробке пробирка с термометром.

Колбу заполняют на $^2/_3$ серной кислотой или глицерином, пробирку с термометром помещают на расстоянии 0,5—1,5 см от дна колбы.

Каротин перед определением тщательно растирают в ступке. Полученный тонкий порошок каротина насыпают в стеклянный капилляр, запаянный с одного конца.

Открытый конец капилляра запаивают и прикрепляют резиновым колечком к термометру.

При определении точки плавления приборчик нагревают медленно, следя за тем, чтобы температура поднималась в минуту не более чем на 1°.

Температуру плавления отмечают по термометру в тот момент, когда все вещество, находящееся в капилляре, расплавится.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА КОЛОРИМЕТРОМ ДЮБОСКА

Количественное определение каротина в подготовленных для колориметрирования растворах его в петролейном эфире или бензине можно проводить с помощью колориметра Дюбоска путем сравнения естественной ок-

раски каротина со стандартными растворами азобензола или бихромата калия. 1 мл этих растворов по интенсивности окраски соответствует определенному содержанию (0,00235 или 0,00208 мг соответственно) каротина.

Содержание каротина при пользовании стандартным раствором азобензола вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{0{,}00235 \cdot b \cdot V \cdot 100}{b_1 \cdot g}, \qquad (7)$$

где x — содержание каротина в исследуемом продукте в миллиграмм-процентах; V — общий объем подвергшегося колориметрированию раствора в миллилитрах; b — показания шкалы стандартного раствора в миллиметрах (обычно ставится на 10 мм); b_1 — показания шкалы испытуемого раствора в миллиметрах (допускаемые колебания в толщине столба исследуемого раствора 8—12 мм); g — навеска исследуемого объекта в граммах; 0,00235 — коэффициент пересчета количества каротина в миллиграммы.

При пользовании стандартным раствором бихромата калия расчет производят по формуле:

$$x = \frac{0{,}00208 \cdot b \cdot V \cdot 100}{b_1 \cdot g}, \qquad (8)$$

где x — содержание каротина в исследуемом продукте в миллиграмм-процентах; 0,00208 — коэффициент пересчета количества каротина в миллиграммы. Остальные обозначения те же, что и в формуле (7).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА ЭЛЕКТРОФОТОКОЛОРИМЕТРОМ ИЛИ СТУПЕНЧАТЫМ ФОТОМЕТРОМ

Можно определить содержание каротина, измеряя величину экстинкции (погашения) его растворов, пользуясь электрофотоколориметром (с дифференциальной или компенсационной схемой устройства) или ступенчатым фотометром.

При определении экстинкции петролейно-эфирных или бензиновых растворов каротина пользуются светофильтром с максимумом пропускания при 450 *mμ*. Наряду с

этим можно проводить определение каротина в его хлороформном растворе. В последнем случае применяют светофильтр с максимумом пропускания 465 $m\mu$.

Содержание каротина в исследуемом растворе определяют с помощью калибровочного графика, который составляется по данным экстинкции, установленной для серии стандартных растворов кристаллического каротина с убывающей концентрацией.

Стандартные растворы готовятся из основного, содержащего 0,003 мг в 1 мл.

Определив в электрофотоколориметре или ступенчатом фотометре экстинкцию исследуемого раствора каротина, по графику находят соответствующее этому раствору содержание каротина, выраженное в миллиграммах в 1 мл.

Содержание каротина вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{a \cdot V \cdot 100}{g}, \qquad (9)$$

где x — количество каротина в исследуемом веществе в миллиграмм-процентах; a — количество каротина в 1 мл исследуемого раствора, найденное по графику в миллиграммах; V — объем исследуемого раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений); g — навеска вещества в граммах; 100 — коэффициент пересчета содержания каротина в процентах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАРОТИНА ПРИБОРОМ З. С. ГРАФСКОЙ

Приготовление стандартных растворов. При определении небольших количеств каротиноидов или каротина, как, например, в молоке, особенно в грудном (так как на исследование берется небольшой объем), можно применять прибор (см. рис. 1) с пробирками-эталонами, содержащими стандартные растворы. Эти растворы готовят из химически чистого трижды перекристаллизованного бихромата калия, высушенного до постоянного веса. Для этого растворяют 360 мг бихромата калия в 1 л воды и путем разведения основного раствора получают все остальные, как указано в табл. 2.

Таблица 2

Приготовление стандартных растворов бихромата калия

№ пробирки	Количество основного раствора в мл	Количество воды в мл	Содержание каротина в 1 мл раствора в мг
1	10	—	0,00208
2	10	2,5	0,00166
3	10	5	0,00138
4	10	7,5	0,00118
5	10	10	0,00104
6	10	12,5	0,00092
7	10	15	0,00083
8	10	20	0,00069
9	10	25	0,00059
10	10	30	0,00052
11	10	35	0,00046
12	10	40	0,00041

Определение каротина в исследуемом растворе проводится путем сравнения окраски его с окраской стандартных растворов. Определение считается законченным, когда установлено совпадение окраски испытуемого раствора с окраской одного из стандартных растворов.

Вычисление результатов анализа. Содержание каротина в исследуемом растворе проводится по формуле (9), в которой:

x — количество каротина или каротиноидов в миллиграммах;

a — количество каротина или каротиноидов в миллиграммах в 1 мл стандартного раствора, окраска которого совпала с окраской исследуемого раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Подготовка материала к анализу

В пищевых продуктах (печень, яйца, молоко, сливочное и топленое масло и другие молочные продукты) можно определить содержание витамина А и каротина, пользуясь одной и той же навеской, так как основные стадии анализа являются для них общими.

Омыление навески взятого на анализ вещества, извлечение неомыляемой фракции, промывание эфирных экстрактов водой и высушивание последних безводным сернокислым натрием проводят так же, как указано в прописи методик, применяемых при определении витамина А.

В остатке после удаления серного эфира витамин А и каротин определяют колориметрически.

Ход анализа

Содержание каротина устанавливается в растворе петролейного эфира или бензина, поэтому неомыляемая фракция после удаления серного эфира растворяется в одном из этих растворителей. Колориметрирование проводится по одному из способов, описанных выше.

Для определения витамина А из общего раствора неомыляемой фракции в петролейном эфире или бензине отбирают пипеткой несколько миллилитров, растворитель отгоняют в токе CO_2, а остаток растворяют в хлороформе.

Содержание витамина в хлороформном растворе устанавливается, как указано в разделе определения витамина А. Колориметрическую реакцию с треххлористой сурьмой дает также каротин. Интенсивность этой окрас-

ки незначительна, но все же она способна несколько завышать истинное содержание витамина А, если в исследуемом продукте присутствует относительно большее количество каротина.

Вычисление результатов анализа

При вычислении содержания витамина А из общего количества синих единиц (витамин А + каротин) вычитают синие единицы, приходящиеся на долю каротина.

Вычисление количества синих единиц, приходящихся на долю каротина, приведено в табл. 3.

Таблица 3

Таблица для определения количества каротина в синих единицах

Число синих единиц	Содержание каротина в γ в 1 мл
0,5	5
0,7	10
1	17
1,3	25
1,5	30
1,8	36
2	46
2,3	55
2,5	64
2,8	75
3	83
3,3	93
3,5	100
3,8	110
4	117

Расчет содержания витамина А в исследуемом объекте производится по приведенным ниже формулам.

Содержание витамина А в гаммах (с поправкой на каротин) вычисляется по формуле:

$$x = \frac{V \cdot 2{,}5 \cdot (a - b)}{g}, \qquad (10)$$

где x — количество витамина А в исследуемом веществе в гаммах на 1 г вещества; g — навеска вещества в

граммах; a — количество синих единиц, установленное при колориметрировании; b — количество синих единиц, приходящееся на долю каротина (устанавливается по табл. 3); V — объем хлороформного раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений); 2,5 — коэффициент пересчета витамина А в гаммы.

Содержание витамина А в интернациональных единицах (с поправкой на каротин) вычисляется по формуле:

$$x = \frac{V \cdot 2{,}5 \cdot (a - b)}{0{,}3 \cdot g}, \qquad (11)$$

где x — количество витамина А в исследуемом веществе в интернациональных единицах на 1 г вещества; 0,3 — коэффициент перевода числа гамм витамина А в интернациональные единицы; все остальные обозначения те же, что и в формуле (10).

Содержание витамина А в молоке вычисляется по формуле:

$$x = \frac{V \cdot 2{,}5 \cdot (a - b) \cdot 100}{g}, \qquad (12)$$

где x — количество витамина А в исследуемом веществе в гамма-процентах; g — количество миллилитров молока, взятое на опеределение; 100 — коэффициент пересчета витамина А на гамма-проценты; все остальные обозначения те же, что и в формуле (10).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА В ГОТОВЫХ БЛЮДАХ

Каротин может содержаться в значительных количествах в супах, приготовленных из зеленого горошка, шпината или щавеля, а также в украинских борщах и свежих щах, в которые полагается класть морковь, красные помидоры или томат-пасту.

В крупяных и картофельных супах, а также в лапше (если в них нет моркови) каротин содержится в незначительном количестве, за исключением сливочного или топленого масла, на котором эти блюда могут быть приготовлены.

Из вторых блюд, содержащих каротин, следует отметить овощное рагу, винегрет, морковные котлеты, а также различные гарниры из зеленых овощей и моркови. Каротин содержится также в яйцах и сметане, которые могут входить в первые и вторые блюда.

Витамин А как в первых, так и во вторых блюдах содержится главным образом в сливочном и топленом масле, а также в сметане и яйцах. В мясе и рыбе витамин А находится в очень небольших количествах, много его в говяжей и свиной печенке.

Каждое блюдо берут на анализ в количестве не менее двух порций и подвергают двух- или троекратному исследованию, только в этом случае можно считать полученные данные достоверными.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА В ПЕРВЫХ БЛЮДАХ

Подготовка материала к анализу

Пробы первых блюд (в количестве двух порций) взвешивают. Затем жидкую часть отделяют от твердой декантацией через марлю в химический стакан емкостью

500—1000 мл[1]. Стакан с жидкой частью блюда ставят в холодильник, где он остается до тех пор, пока весь жир не затвердеет, после чего последний осторожно снимают и растворяют в 40 мл серного эфира. Из этого раствора отбирают $^1/_4$ часть и присоединяют к основному экстракту, полученному при обработке плотной части первого блюда.

Плотную часть блюда взвешивают, растирают в ступке и перемешивают. Из растертой массы отбирают пробу, составляющую $^1/_4$ часть общего веса плотной части двух порций блюда, растирают еще раз для высушивания с 10 г безводного сернокислого натрия, переносят количественно в химический стакан и заливают 20 мл этилового спирта.

В этот же стакан сливают также спирт (5—10 мл), которым обмывалась ступка. Содержимое стакана перемешивают стеклянной палочкой и заливают 50 мл серного эфира.

Эфир берут в таком количестве, чтобы он покрывал всю пробу. Стакан закрывают стеклом и оставляют на 10 минут. После этого эфирно-спиртовой экстракт сливают в колбу, а остаток экстрагируют 30—35 мл эфира еще 3—4 раза до полного изчезновения желтой окраски экстракта.

Собранные вместе эфирные экстракты выпаривают на водяной бане в токе CO_2 до половины объема, затем охлаждают и промывают водой. Промытый эфирный экстракт высушивают безводным сернокислым натрием (6—8 г), фильтруют, а эфир удаляют в токе CO_2. К остатку приливают 20 мл 20% спиртового раствора КОН и проводят омыление на водяной бане при температуре 85—90° в течение 1—2 часов. Омыленный раствор охлаждают, разбавляют двухкратным объемом воды по отношению ко взятому количеству спирта и производят извлечение неомыляемой фракции серным эфиром. На первую экстракцию берут не менее 75 мл, на вторую и третью — по 30—40 мл эфира. Эфирные вытяжки промывают 3—4 раза водой, высушивают безводным сернокислым натрием, фильтруют и отгоняют серный эфир

[1] Суп-пюре гороховый или картофельный сначала подвергают центрифугированию. Жидкую часть (вместе с жиром) декантируют и ставят в холодильник для затвердевания жира. Дальше анализ проводят так же, как и в других супах.

в токе CO_2. Остаток, содержащий витамин А и каротиноиды, разводят в 10 мл петролейного эфира (температура кипения 60—80°).

Определение витамина А

Из общего объема раствора неомыляемой фракции в петролейном эфире отбирают пипеткой для определения витамина А 5 мл, эфир отгоняют в токе CO_2, а остаток растворяют в 1,5 мл хлороформа. При анализе блюд, приготовленных на витаминизированном масле или жире, остаток растворяют в большем объеме хлороформа (3—5 мл).

Содержание витамина А в хлороформном растворе устанавливается, как указано в разделе по определению витамина А.

Определение суммы каротиноидов

Содержание суммы каротиноидов устанавливается колориметрически в той части объема петролейного эфира, которая осталась после отбора 5 мл на определение витамина А. Колориметрическое определение описано выше.

Определение каротина

Для того чтобы установить содержание каротина, необходимо применить хроматографическую адсорбцию. Разделение каротиноидов проводят на адсорбенте окиси магния так же, как это описано в методике, применяемой при определении каротина в свежем растительном материале. С этой целью из раствора неомыляемой фракции в петролейном эфире, то есть из 5 мл, оставшихся после отбора пробы на определение витамина А, берут 4 мл и пропускают их через колонку с окисью магния, элюируя каротин петролейным эфиром. Прошедший через адсорбент раствор каротина концентрируют на водяной бане в токе CO_2 до небольшого объема (2—3 мл) и затем доводят петролейным эфиром в мерной колбочке до 10 мл. Если каротина содержится мало, то элюат отгоняют полностью, а остаток растворяют в 3—5 мл петролейного эфира. Колориметрирование проводится по одному из описанных выше способов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА А И КАРОТИНА ВО ВТОРЫХ БЛЮДАХ

Определение витамина А, каротиноидов и каротина во вторых блюдах производится так же, как и в плотной части первых блюд.

Содержание витамина А в первых и вторых блюдах вычисляют по приведенной ниже формуле при условии, что для определения витамина была взята $^1/_4$ часть от двух порций блюд (при определении упрощенным прибором):

$$x = \frac{a \cdot 2{,}5 \cdot V \cdot 2}{1000}, \qquad (13)$$

где x — количество витамина А в исследуемых блюдах в милиграммах на вес одной порции; a — число синих единиц, установленное при колориметрировании; 2,5 и 1000 — коэффициенты для перевода содержания витамина А в миллиграммы; 2 — коэффициент пересчета содержания витамина А на одну порцию блюда (этот коэффициент применяют, если исследуют $^1/_4$ часть двух порций); V — объем исследуемого раствора в миллилитрах с учетом разведения раствора.

Содержание каротиноидов в пересчете на каротин в первых и вторых блюдах вычисляют по приведенной ниже формуле при условии, что определение каротиноидов проводилось в $^1/_4$ части от веса двух порций блюд, взятых для анализа, и в качестве стандарта служил раствор азобензола (при определении колориметром Дюбоска):

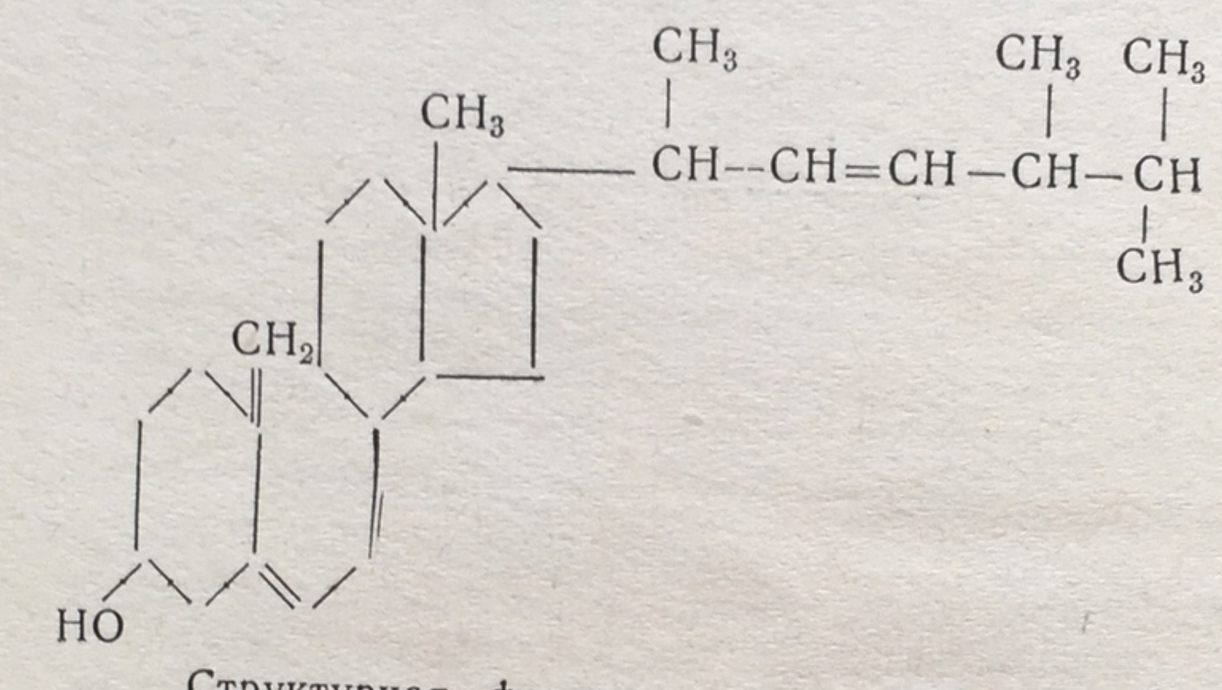
$$x = \frac{0{,}00235 \cdot b \cdot V \cdot 2}{b_1}, \qquad (14)$$

где x — количество каротиноидов в миллиграммах (в пересчете на каротин) на вес одной порции; 0,00235 — коэффициент пересчета (количество каротина в миллиграммах в 1 мл раствора, соответствующее по окраске стандартному раствору); b — показание шкалы стандартного раствора в миллиметрах (ставится обычно на 10 мм); b_1 — показание шкалы исследуемого раствора в миллиметрах; 2 — коэффициент пересчета содержания каротиноидов на одну порцию блюда; V — объем иссле-

дуемого раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений).

Содержание каротина, определяемого с применением хроматографической адсорбции, в первых и вторых блюдах вычисляют по той же формуле, которая приводится для каротиноидов. Разница состоит лишь в том, что при подсчете объема исследуемого раствора и его разведений учитывают также количество миллилитров раствора, которое пропускалось через адсорбент.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ



Структурная формула витамина D_2 (кальциферола)

Принцип метода

Витамин D_2 определяется по цветной реакции с трехлористой сурьмой в хлороформном растворе. Интенсивность образующейся при этой реакции окраски (желтовато-розовой) пропорциональна концентрации витамина D_2, которая может быть определена количественно в электрофотоколориметре или ступенчатом фотометре с применением зеленого светофильтра 500 $m\mu$.

Масляные концентраты предварительно омыляют спиртовым раствором щелочи (KOH); неомыляемую фракцию, содержащую витамин D_2, экстрагируют серным эфиром, который затем удаляют. Сухой остаток растворяют в хлороформе и в нем определяют содержание витамина D_2.

При определении витамина D_2 в спиртовых концентратах сначала отгоняют растворитель, а полученный сухой остаток растворяют в хлороформе, в котором затем и определяют содержание витамина D_2.

Ниже приводятся способы определения витамина D_2 в масляных и спиртовых препаратах.

Аппаратура

1. Ступенчатый фотометр (модель прибора — вертикальная).
2. Электрофотоколориметр.

Посуда

Применяется та же посуда, что и при определении витамина А.

Реактивы

1. Кальциферол кристаллический х. ч.
2. Эфир серный х. ч. или наркозный.
3. Хлороформ ч. д. а.
4. Спирт-ректификат (перегнанный над NaOH).
5. Натрий сернокислый безводный х. ч. или кристаллический прокаленный.
6. Раствор KOH, 60% водный.
7. Ацетилхлорид (температура кипения 51°[1]).
8. Треххлористая сурьма.
9. Натрий едкий х. ч.
10. Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.
11. Йодистый калий.
12. Углекислый газ или азот из баллона.

Примечание. Проверка качества применяемых реактивов и очистка проводятся так же, как при подготовке их к определению витамина А.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 В ВЫСОКОАКТИВНЫХ СПИРТОВЫХ КОНЦЕНТРАТАХ[2]

При определении витамина D_2 в высокоактивных спиртовых концентратах сначала отбирают пипеткой пробу в количестве 1 мл и переносят для разбавления спиртом в мерную колбочку емкостью 10 или 25 мл в зависимости от содержания витамина D_2 в исследуемом кон-

---

[1] Сохраняется в склянке или капельнице из темного стекла с притертой пробкой.

[2] Содержание витамина D_2 в его спиртовых и масляных препаратах можно определять с применением тех же методов, которые приводятся здесь для витамина D_2.

центрате (100 000 или 200 000 ИЕ в 1 мл). Разбавление спиртом производится с таким расчетом, чтобы в 1 мл раствора содержалось не более 10 000 ИЕ витамина D_2. Из разбавленного спиртового раствора отбирают вторую пробу в количестве 1 мл в колбочку Вюрца (50 мл) и производят удаление спирта в токе CO_2 или вакууме при нагревании на водяной бане. Для удаления следов спирта к остатку (после отгонки спирта) приливают 2 мл хлороформа, который затем также отгоняют в токе CO_2 или вакууме. Полученный сухой остаток растворяют в хлороформе в таком количестве, чтобы витамина D_2 в 1 мл содержалось (по приблизительному расчету) 200—1000 ИЕ. В этом растворе проводят определение витамина D_2 по реакции с треххлористой сурьмой с применением одного из приборов — ступенчатого фотометра или электрофотоколориметра.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 В МАСЛЯНЫХ КОНЦЕНТРАТАХ [1]

Масляные концентраты витамина D_2 в зависимости от указанного на этикетке содержания витамина (от 10 000 до 50 000 ИЕ в 1 мл) берут на определение в количестве 0,5—1 г. Взвешивание пробы производится в колбочке емкостью 100 мл. Для омыления взятой навески в колбочку наливают 10 мл спирта и 1,8 мл 60% водного раствора КОН, после чего пробу концентрата нагревают на водяной бане с воздушным холодильником в течение часа при температуре кипения спирта. Об окончании омыления узнают по просветлению раствора и отсутствию в нем отдельных блесток жира. Омыленному раствору дают остыть или охлаждают его, а затем разбавляют 20 мл дистиллированной воды. Неомыляемую фракцию извлекают в делительной воронке серным эфиром. На первую экстракцию так же, как при извлечении витамина А, берут 50 мл, а на две последующие — по 25 мл эфира. Объединенные эфирные вытяжки промывают водой до полного удаления следов щелочи (проба на лак-

[1] В долго хранившихся (свыше 5 лет) масляных препаратах нельзя определить витамин D_2 изложенным химическим методом. Подобные препараты необходимо проверять биологическим методом, поскольку между данными, полученными этими способами, отмечалось расхождение.

мусовую бумажку) и сушат 30 минут безводным Na_2SO_4, который вносят в эфирный экстракт в количестве 6—7 г.

Высушенный эфирный раствор фильтруют, а оставшийся на фильтре сернокислый натрий промывают небольшим количеством эфира, который присоединяется к основному раствору. Затем эфир отгоняют на водяной бане в токе CO_2, а остаток растворяют в таком объеме хлороформа, чтобы в 1 мл раствора содержалось не меньше 200 и не больше 1000 ИЕ витамина D_2.

Концентрацию витамина в хлороформном растворе неомыляемой фракции устанавливают с применением ступенчатого фотометра или электрофотоколориметра.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 СТУПЕНЧАТЫМ ФОТОМЕТРОМ ТИПА ПУЛЬФРИХА

Принцип фотометрии заключается в количественном определении светопоглощения (экстинкции), производимого окрашенным раствором в определенной части видимого спектра.

Применяемый светофильтр должен быть с достаточно узкой полосой пропускания, желательно в пределах 480—520 mμ.

Составление калибровочного графика. При составлении калибровочного графика пользуются серией хлороформных растворов кальциферола, содержащих в 1 мл от 200 до 1000 ИЕ витамина D_2. Основной раствор готовят путем растворения кальциферола в спирту, так как хлороформный раствор неустойчив. Навеску химически чистого кальциферола (взятую на аналитических весах в количестве 10 мг) растворяют в 100 мл спирта, перегнанного над NaOH (подготовку спирта см. в разделе «Определение витамина А»).

В 1 мл полученного спиртового раствора должно содержаться по расчету 4000 ИЕ витамина D_2 (так как 10 мг кальциферола соответствуют 400 000 ИЕ витамина D_2). Основной раствор может храниться в холодильнике в течение года.

Для приготовления стандартного раствора из основного раствора отбирают пипеткой 10 мл и добавляют 5 мл хлороформа. Затем оба растворителя отгоняют в токе CO_2, а полученный сухой остаток растворяют в 10 мл хлороформа. Из этого раствора отбирают пипеткой

точно отмеренные 0,5; 1; 1,5; 2 и 2,5 мл, добавляют хлороформ соответственно в количестве 9,5; 9; 8,5; 8 и 7,5 мл, чтобы общий объем каждого раствора составлял 10 мл.

В приготовленных растворах проводят определение величин экстинкции с применением фотометра.

Калибровочный график вычерчивают путем нанесения на оси ординат значений экстинкции для каждого раствора, а на оси абсцисс — концентрации витамина D_2 в интернациональных единицах на 1 мл раствора.

Колориметрирование. Определение в приборе начинают с включения лампочки осветителя. Затем в поле зрения устанавливают светофильтр S-50, а барабаны правой и левой диафрагмы переводят в положение 100 (что соответствует максимуму пропускания). В одну из кювет прибора емкостью 10 мл вносят 0,75 мл испытуемого хлороформного раствора, 3 капли ацетилхлорида и 4,5 мл раствора треххлористой сурьмы. В другую (парную) кювету наливают те же реактивы, а испытуемый раствор заменяют 0,75 мл хлороформа. Обе кюветы закрывают стеклянными крышками и оставляют на 3 минуты в темноте для развития максимума окраски. Точно через 4 минуты после прибавления раствора треххлористой сурьмы приступают к измерению экстинкции. Интенсивность окраски полей прибора уравнивают вращением диафрагмы барабана.

Величина экстинкции исследуемого раствора указана красными цифрами шкалы барабана.

Измерение производят не менее трех раз и берут среднее арифметическое из всех отсчетов.

Примечание. Для измерения можно применять кювету другой емкости, однако соотношение между количеством испытуемого раствора и треххлористой сурьмой (1 : 6) необходимо сохранить.

Вычисление результатов анализа. Вычисление содержания витамина D_2 в спиртовом концентрате:

$$x = \frac{c \cdot V}{g}, \qquad (15)$$

где x — количество витамина D_2 в 1 мл спиртового концентрата в интернациональных единицах; c — найденное

по калибровочному графику количество витамина D_2 в 1 мл в интернациональных единицах; V — общий объем исследуемого раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений); g — количество взятого на анализ концентрата в миллилитрах.

Вычисление содержания витамина D_2 в масляном концентрате[1].

$$x = \frac{c \cdot V \cdot d}{g}, \qquad (16)$$

где x — количество витамина D_2 в 1 мл масляного концентрата в интернациональных единицах; c — найденное по калибровочному графику количество витамина D_2 в 1 мл раствора в интернациональных единицах; V — общий объем исследуемого раствора в миллилитрах (с учетом всех его разведений); g — навеска концентрата в граммах; d — удельный вес масляного раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 ЭЛЕКТРОФОТОКОЛОРИМЕТРОМ ФЭК-М

Составление калибровочного графика. Калибровочный график составляют по серии стандартных растворов, содержащих от 200 до 1000 ИЕ витамина D_2 в 1 мл.

Приготовление этих растворов из основного, содержащего в 1 мл 4000 ИЕ витамина D_2 изложено при описании определения витамина с помощью ступенчатого фотометра.

Колориметрирование. Сначала прибор приводят в рабочее положение: включают лампу осветителя, устанавливают светофильтр, имеющий максимум пропускания при 500 mμ, затем в две парные кюветы наливают раствор треххлористой сурьмы и стрелки гальванометра подводят к нулевой экстинкции (100% пропускания).

После установки прибора в нулевое положение в одной из кювет раствор треххлористой сурьмы заменяют

---

[1] При вычислении витамина D_2 в масляных концентратах с активностью 10 000 ИЕ в 1 мл надо вносить поправку на вещества, содержащиеся в неомыляемой фракции рафинированного подсолнечного масла и завышающие истинное содержание витамина в препарате. Для этого найденное содержание витамина D_2 уменьшают на 25%.

1 мл исследуемого раствора, к которому добавляют 3 капли ацетилхлорида и 6 мл треххлористой сурьмы.

Через 4 минуты после прибавления раствора треххлористой сурьмы отмечают показание гальванометра. Концентрацию витамина D_2 в 1 мл раствора находят по калибровочному графику.

Вычисление результатов анализа. Расчет содержания витамина D_2 в препаратах такой же, как и при определении ступенчатым фотометром.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА D_2 БИОЛОГИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

Принцип метода

D-витаминную активность определяют на белых крысах в профилактических опытах длительностью 15 дней путем сравнения антирахитического действия различных доз исследуемого объекта со стандартным раствором, имеющим определенную D-витаминную активность.

Подготовка препаратов для исследования

Среднюю пробу масляных и спиртовых препаратов витамина D_2 разводят в подсолнечном масле, не содержащем витамина D_2. Для первого разведения берут пипеткой не менее 0,5 мл. Из первого разведения приготовляют растворы, предназначаемые для непосредственного скармливания крысам. Витаминизированный рыбий жир растворяют в подсолнечном масле, согласно выбранным дозам без предварительного разведения.

Для определения витамина D_2 в драже отбирают среднюю пробу в количестве 30 штук, взвешивают (узнается вес одной штуки драже) и тщательно растирают.

Из растертой массы драже отвешивают для анализа среднюю навеску на технохимических весах в 15 г при весе одной штуки драже 1 г и в 3,75 г при весе одной штуки драже 0,25 г. Затем производят четырехкратное извлечение витамина из измельченной пробы серным эфиром. При навеске драже 15 г в первый раз берут 100 мл серного эфира, а последующие 3 раза по 75 мл. При навеске драже в 3,75 г количество серного эфира несколько уменьшают: первый раз берут 75 мл, а последующие три раза по 50 мл. Эфир отгоняют в токе углекислоты. Сухой остаток растворяют в подсолнечном масле и из полученного D_2-витаминного раствора приго-

товляют соответствующие разведения, согласно выбранным дозам. Разведенные растворы хранят в леднике в склянках, закрытых пробками.

Постановка опытов на животных

Опыт проводится на белых крысах 1—1½-месячного возраста весом 40—50 г; крыс каждой семьи по возможности равномерно распределяют по группам в количестве не менее 10 в каждой группе. Взвешивание крыс проводят при отборе их на опыт и на 16-й день эксперимента. При рассмотрении результатов анализа не учитывают животных, потерявших в течение опыта в весе.

В течение опыта все крысы получают один из следующих рахитогенных рационов:

Рацион № 1	Состав рациона в %%
Пшеничная мука 30 или 72%	90
Сухие пивные или пекарские дрожжи	5
Очищенный мел	3
Пищевая соль	2

Рацион № 2	
Пшеничная мука 30 или 72%	50
Овсяная мука	45
Очищенный мел	4
Пищевая соль	1

Составные части рациона тщательно смешивают, из смеси выпекают хлеб (каждая крыса получает примерно по 20 г хлеба в день). Определение D-витаминной активности проводят одновременно в двух-трех препаратах параллельно с D-витаминным эталоном. Стандартным раствором — эталоном витамина D в опытах служит раствор кальциферола в подсолнечном масле.

Испытуемые и эталонные растворы приготовляются обычно в четырех разведениях. Исследуемые препараты и D-витаминный эталон скармливают соответствующим группам крыс 2 раза в течение опыта: на 1-й и 7-й день.

Для скармливания животным испытуемого и эталонного растворов применяют пипетку длиной 8—10 мм с

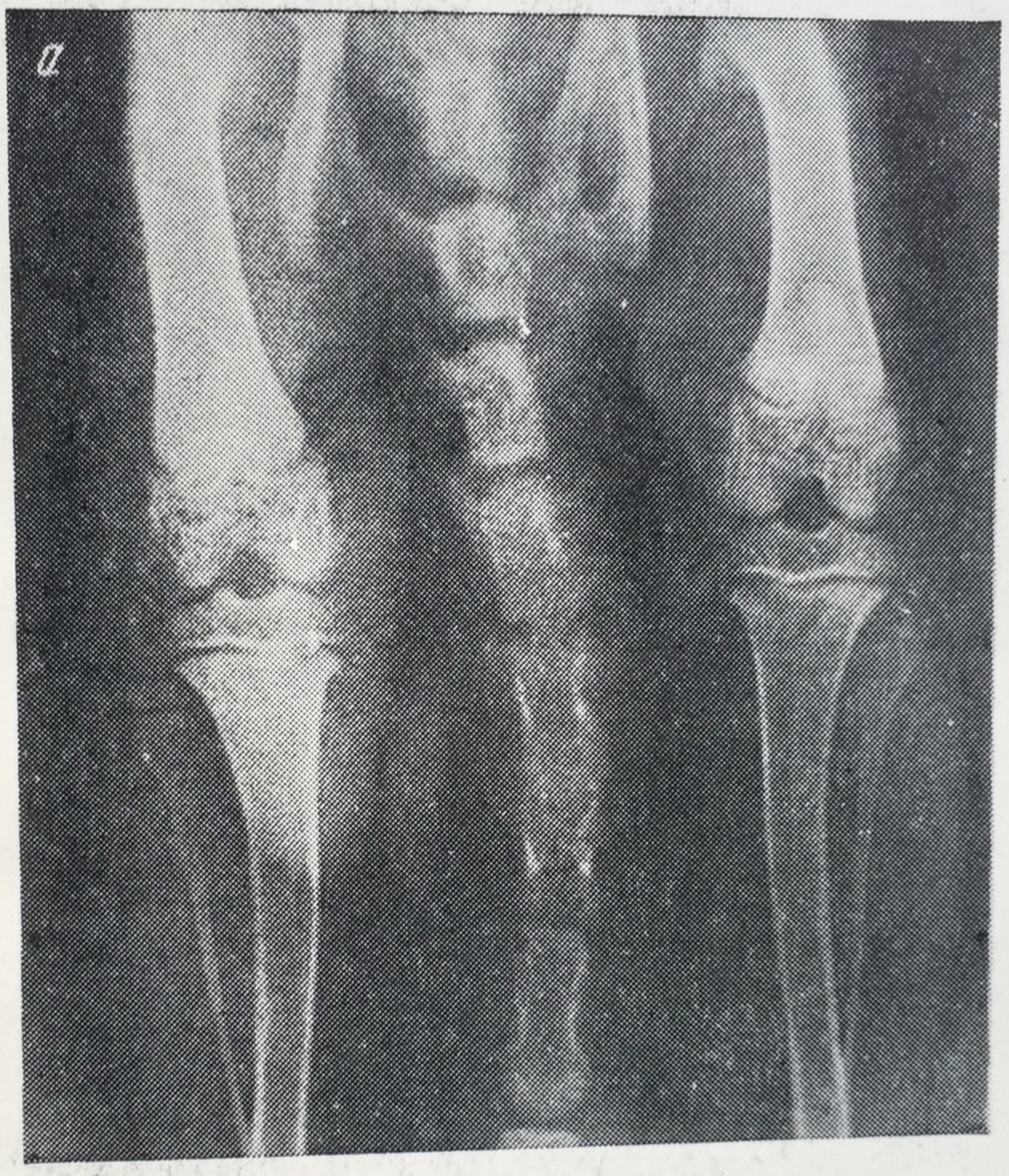


Рис. 3*а*. Нормальное строение костей.

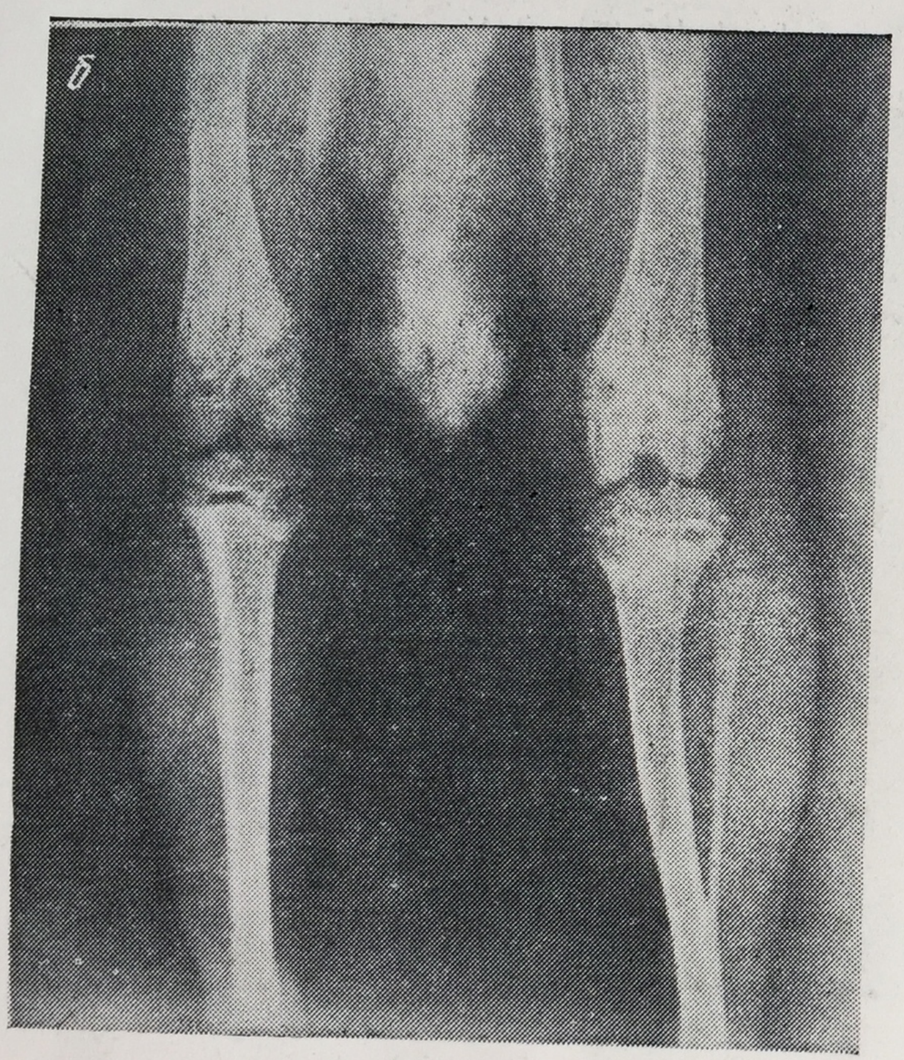


Рис. 3*б*. Признаки рахита первой степени.

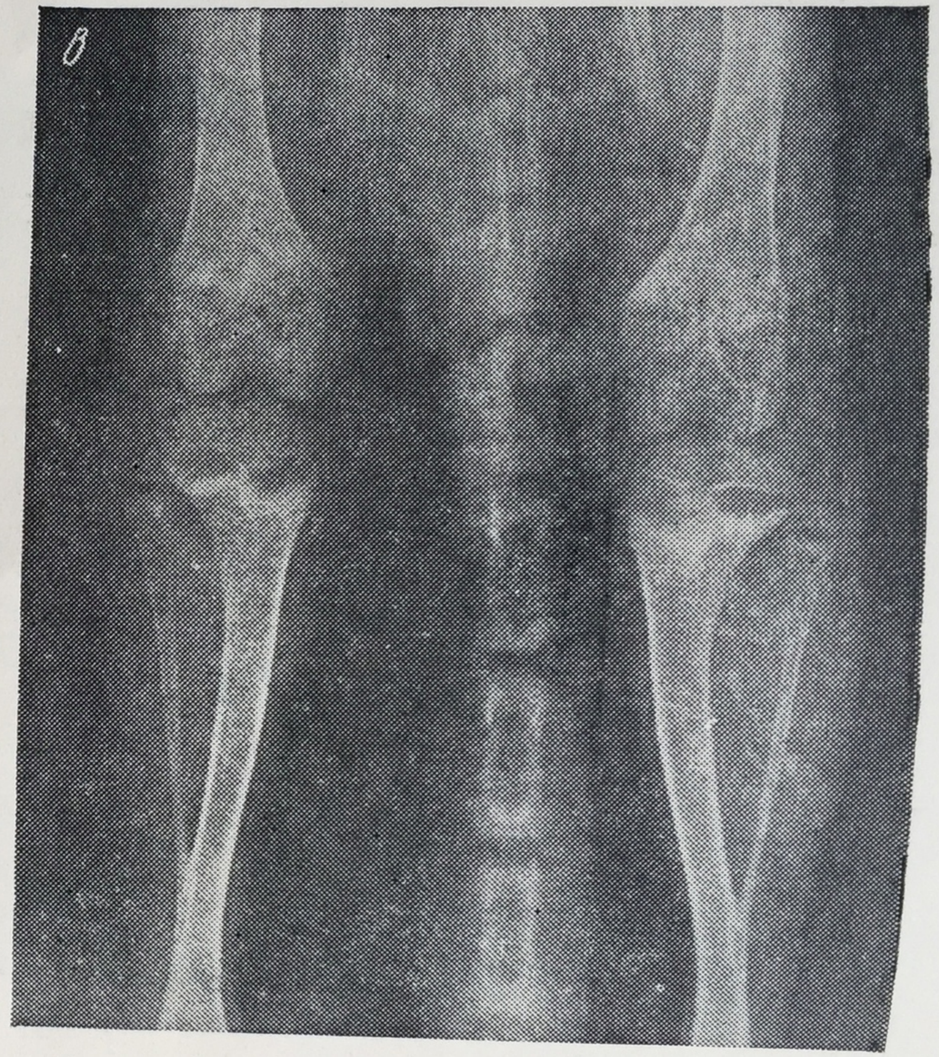
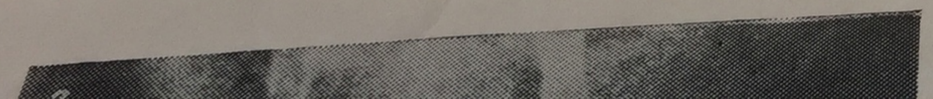
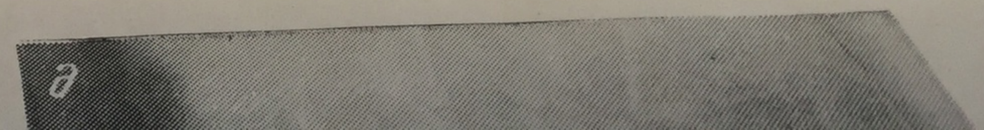


Рис. 3*в*. Признаки рахита второй степени.





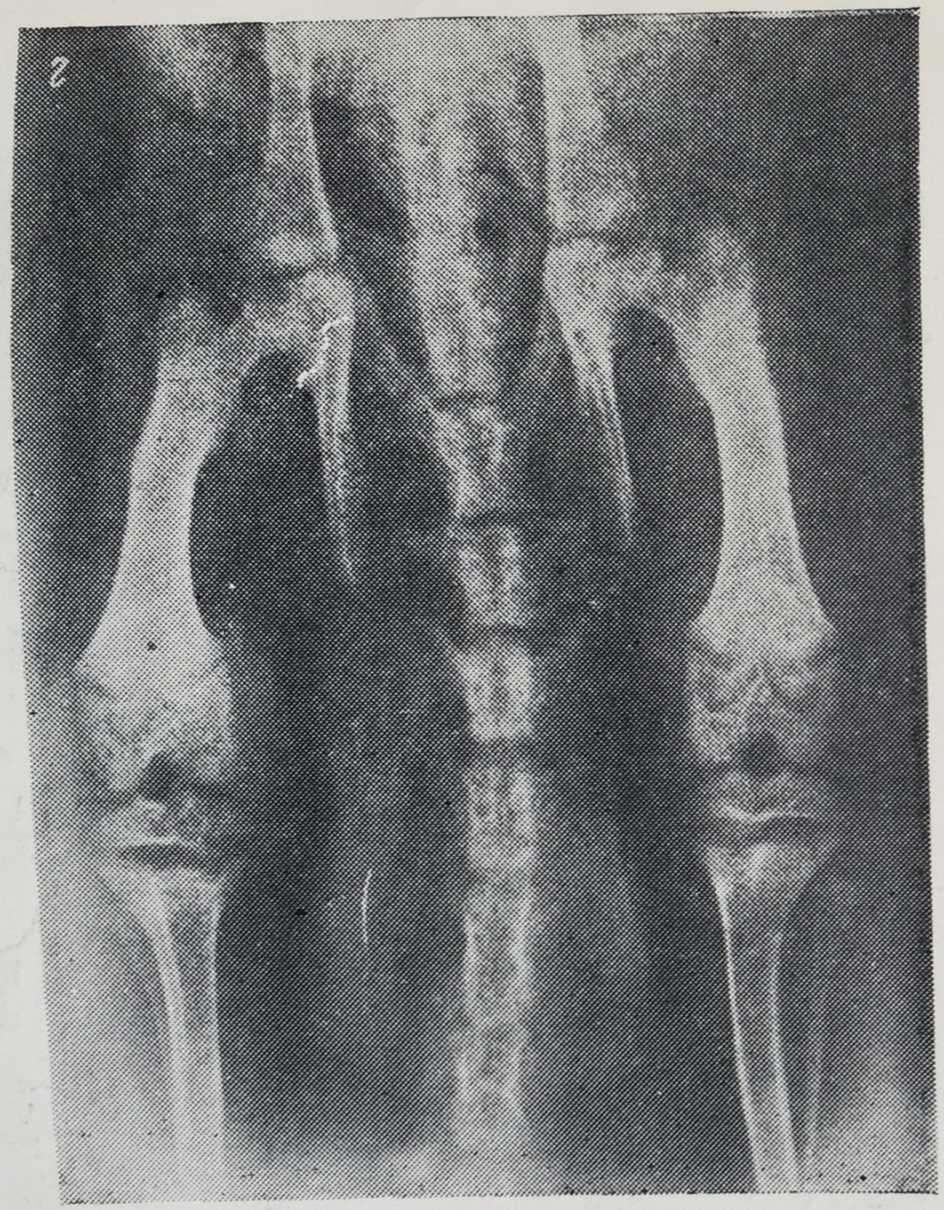


Рис. 3г. Признаки рахита третьей степени.

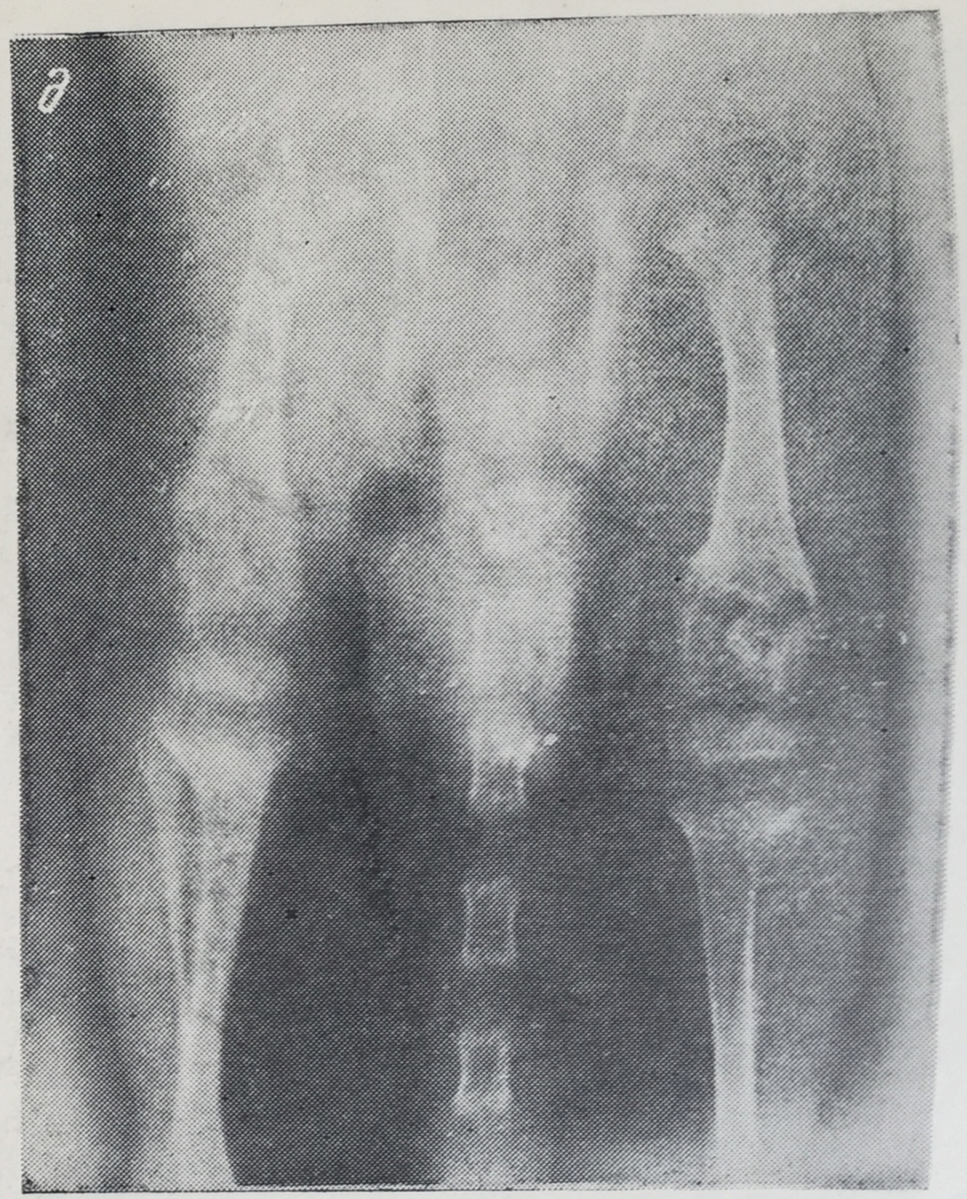


Рис. 3д. Признаки рахита четвертой степени.

резиновым балло
или 0,1 мл в за
дозы (весовым п
Для установ
крыс производят
генографическим

Методы

Рентгенограф

фию задних кон
тывают количес
костей конечнос
ми признаками
ляют по пятиба
жести рахита п
ских снимков
рахита служит
физом и эпифи
го (см. рис. 3 –

Проба на ч

новки у убиты
которые после
формалина на
10 минут водо
линии при по
раствор азот
ставляют на
на 10—20 ми
появится сер
промывают
фита на 10–
вают водой.
физарного
резко выдел
пени рахита
тоде.

В

При вы
необходим
скую дозу
витамина

резиновым баллончиком. Пипетку калибруют на 0,05 или 0,1 мл в зависимости от скармливаемой суточной дозы (весовым путем).

Для установления количества пораженных рахитом крыс производят определение состояния костей рентгенографическим методом и пробой на черту.

Методы определения состояния костей

Рентгенографический метод. Производят рентгенографию задних конечностей живых или убитых крыс и учитывают количество животных с нормальным строением костей конечностей и количество их с явно выраженными признаками рахита. Степень тяжести рахита определяют по пятибалльной шкале. Установление степени тяжести рахита производится путем сравнения рентгеновских снимков с контрольными: показателем степени рахита служит ширина хрящевой прослойки между диафизом и эпифизом костей и контуры краев того и другого (см. рис. 3 — *а, б, в, г* и *д*).

Проба на черту. При отсутствии рентгеновской установки у убитых крыс вырезают большеберцовые кости, которые после очистки от мышц помещают в 4% раствор формалина на 18—24 часа. Промыв кости в течение 5—10 минут водой, их рассекают продольно по медиальной линии при помощи острого лезвия и погружают в 0,5% раствор азотнокислого серебра. После этого кости выставляют на свет (солнечный или яркой электролампы) на 10—20 минут и, как только на поверхности разреза появится серая окраска средней интенсивности, быстро промывают водой и переносят в 5% раствор гипосульфита на 10—15 минут; после чего вновь быстро промывают водой. На поверхности разреза в области зоны эпифизарного окостенения на темном фоне костной ткани резко выделяется светлая полоса хряща. Показатели степени рахита те же, что и при рентгенографическом методе.

Вычисление результатов исследования

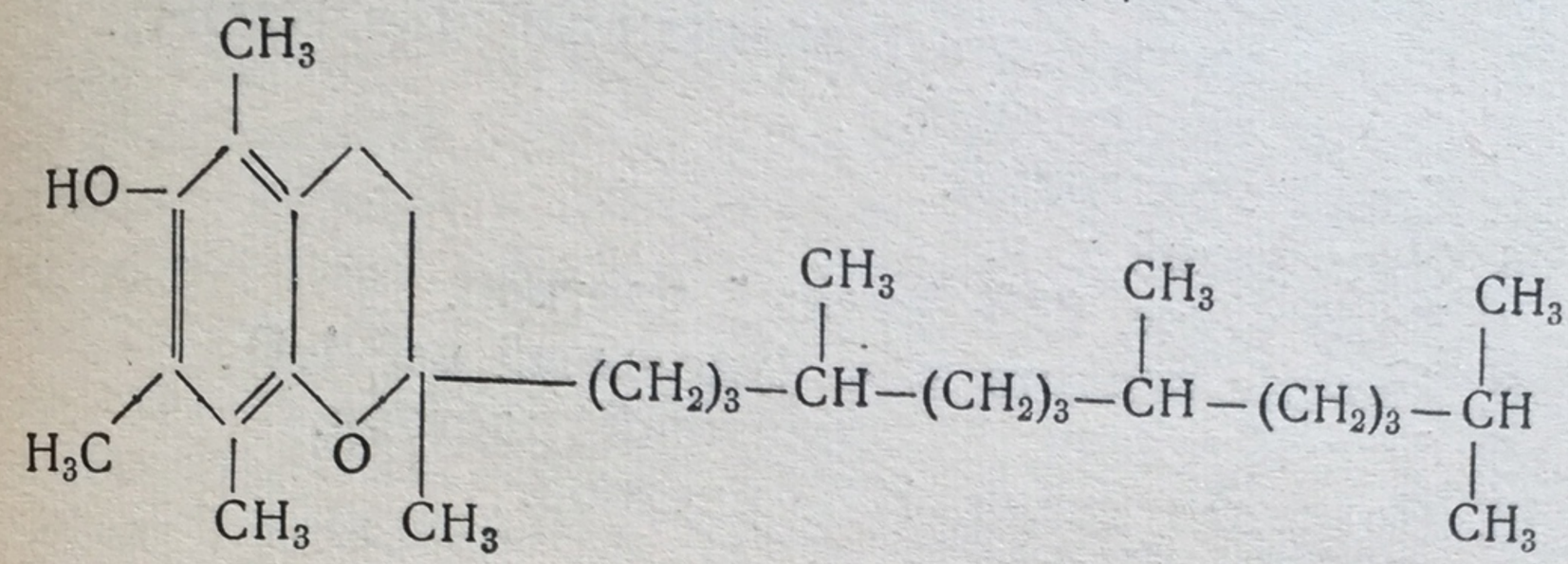
При вычислении количества витамина D_2 в препарате необходимо определить минимальную профилактическую дозу. Под минимальной профилактической дозой витамина D понимают минимальное количество его, пре-

дохраняющее от рахита не менее 80% крыс данной группы. Определив, какая доза исследуемого препарата и эталона витамина D соответствует минимальной профилактической, вычисляют содержание витамина D по формуле:

$$x = \frac{b}{a}, \tag{17}$$

где x — содержание витамина D в 1 мл исследуемого препарата в интернациональных единицах; a — минимальная профилактическая доза исследуемого препарата в интернациональных единицах; b — минимальная профилактическая доза эталона витамина D в интернациональных единицах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е ХИМИЧЕСКИМ МЕТОДОМ



Структурная формула α - токоферола

Принцип метода

Основой для химических методов определения витамина Е (в виде суммы токоферолов) послужила способность токоферолов давать при окислении в определенных условиях окрашенные продукты реакции.

Азотнокислый метод основан на колориметрическом измерении интенсивности красной окраски, возникающей при окислении токоферолов азотной кислотой в спиртовом растворе.

При определении витамина Е в масляных и спиртовых препаратах последние подвергают сначала щелочному гидролизу. Из гидролизата витамин Е извлекают серным эфиром, который затем удаляется в токе CO_2. Полученный сухой остаток растворяют в абсолютном спирте и проводят определение витамина Е по реакции с азотной кислотой в ступенчатом фотометре.

Ниже приводится описание способа определения токоферолов в масляных и спирто-сахарных препаратах.

Аппаратура

1. Ступенчатый фотомер (модель прибора — вертикальная).

Посуда

Применяется та же посуда, что и при определении витамина А.

Реактивы

1. α-токоферолацетат х. ч. в масле. Препарат, содержащий в 1 мл 100 мг α-токоферола.
2. Эфир этиловый (серный) или наркозный.
3. Спирт-ректификат (перегнанный над NaOH).
4. Спирт абсолютный.
5. Спирт метиловый.
6. Натр едкий х. ч.
7. Кали едкое, 60% водный раствор.
8. Азотная кислота х. ч. (удельный вес 1,4).
9. Фенолфталеин, 1% спиртовой раствор.
10. Йодистый калий, 10% раствор.
11. Углекислый газ.

Примечание. Очистка спирта-ректификата перегонкой над твердым NaOH описана в разделе «Определение витамина А».

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е В СПИРТО-САХАРНЫХ И МАСЛЯНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Отбор пробы для анализа. Перед отбором пробы масляные, особенно спирто-сахарные препараты, в которых при хранении выпадает осадок сахара, должны быть тщательно перемешаны, что производится путем многократного перевертывания флакона.

Пробу для анализа из стандартных препаратов отбирают в количестве 1—2 г. При исследовании концентратов α-токоферолацетата в масляном растворе для анализа отвешивают навеску около 0,2 г.

Ход анализа. Навеску препарата, взвешенную на аналитических весах, помещают в колбу емкостью 100—150 мл, добавляют 2 мл водного 60% раствора KOH, 10 мл этилового (или метилового) спирта и подвергают смесь омылению с обратным воздушным холодильником на водяной бане в течение 15 минут при температуре кипения спирта.

Омыленный раствор охлаждают, разбавляют 20 мл воды и переносят количественно в делительную воронку, в которой производят извлечение неомыляемой фрак-

ции серным эфиром. На первую экстракцию берут 50 мл, а на две последующие — по 25 мл эфира. Эфирные вытяжки, соединенные вместе, промывают в делительной воронке 3—4 раза водой до удаления следов щелочи (проба на лакмусовую бумажку или фенолфталеин) и высушивают безводным сернокислым натрием, который вносят в колбочку в количестве 5—7 г. Высушенный прозрачный экстракт фильтруют, а сернокислый натрий промывают на фильтре небольшим количеством эфира, который присоединяют к основному экстракту. Затем эфир отгоняют на водяной бане в токе CO_2.

Полученный сухой остаток растворяют в 5 мл абсолютного спирта в колбочке емкостью 50—100 мл, сюда же приливают 1 мг концентрированной азотной кислоты удельного веса 1,4 и проводят окисление токоферолов на заранее подготовленной кипящей водяной бане. Для этого колбу закрывают пробкой с воздушным холодильником и реакционную смесь кипятят в течение 3 минут (необходимо строго соблюдать продолжительность кипячения). Через 3 минуты колбочку вынимают из бани, охлаждают проточной водой или водой со льдом и оставляют на 15 минут в темноте для развития максимума окраски. Затем реакционную смесь переводят количественно в мерную колбочку на 25 мл и доводят абсолютным спиртом до метки.

Если при этом образуется осадок, то его отфильтровывают, но на фильтре не промывают, чтобы не изменить объема спиртового раствора.

В конечном растворе витамин Е должен содержаться в количестве не менее 100 и не более 400 γ в 1 мл, так как только в этих пределах можно проводить определение по интенсивности окраски, образующейся при окислении витамина Е азотной кислотой.

В полученном окрашенном спиртовом растворе витамин Е определяют по экстинкции, величину которой находят с помощью фотометра Пульфриха или фотоэлектроколориметра, применяя синий светофильтр, имеющий максимум пропускания в области спектра 470 $m\mu$.

В качестве контрольного раствора применяют абсолютный этиловый спирт, 5 мл которого нагревают так же, как исследуемый раствор, с 1 мл концентрированной азотной кислоты в течение 3 минут на кипящей водяной бане. После охлаждения реакционную смесь

разбавляют абсолютным спиртом до того конечного объема, до которого была доведена проба исследуемого раствора.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Е ФОТОМЕТРОМ ПУЛЬФРИХА

Определение в приборе начинают с включения лампочки осветителя, затем в поле зрения устанавливают светофильтр S-47, а барабаны правой и левой диафрагмы переводят в положение 100. Затем одну из парных кювет наполняют испытуемым раствором, а другую — холостой пробой. Обе кюветы закрывают стеклянными крышками и устанавливают на оптическом столике. Установив кюветы, приступают к измерению, уравнивая интенсивность окраски полей прибора путем вращения диафрагмы, которая соответствует холостому раствору. Отсчет производят по красным цифрам шкалы барабана, показывающим значение экстинкции (Е) для исследуемого раствора. Измерение производят не менее трех раз и берут среднее арифметическое из всех отсчетов. Концентрацию витамина Е в исследуемом растворе находят по калибровочному графику, где каждому значению найденной экстинкции соответствует определенное содержание витамина Е в 1 мл раствора.

Калибровочный график составляют по серии стандартных спиртовых растворов с возрастающей концентрацией α-токоферола в пределах от 100 до 400 γ в 1 мл. Содержащийся в этих растворах α-токоферол подвергают окислению азотной кислотой и по интенсивности окрашенного продукта реакции находят величину экстинкции для каждого раствора.

Для приготовления стандартных растворов может служить масляный препарат, содержащий в 1 мл 100 мг α-токоферолацетата. Навеску в 0,5 г такого препарата, точно отвешенную на аналитических весах, омыляют спиртовым раствором КОН, как указано выше. Выделенную неомыляемую фракцию (остаток после отгонки эфира) растворяют в мерной колбочке в 50 мл абсолютного спирта. Из этого раствора, содержащего по расчету в 1 мл 1000 γ α-токоферола, отбирают пипеткой в колбочки на 50—100 мл точно отмеренные количества (1, 2, 3 и 4 мл) спиртового раствора. К указанным ко-

личествам добавляют абсолютный спирт соответственно 4, 3, 2 и 1 мл, чтобы объем жидкости составлял 5 мл. Затем в каждую колбочку приливают по 1 мл азотной кислоты удельного веса 1,4 и проводят реакцию окисления на кипящей водяной бане в течение 3 минут, после чего колбочки охлаждают и оставляют на 15 минут в темноте. По истечении этого промежутка времени объем каждой жидкости доводят абсолютным спиртом до 10 мл. В результате получаются растворы, содержащие соответственно первоначально взятым количествам исходного раствора в 1 мл: 100,200,300 и 400 γ α-токоферола. В приготовленных растворах, окрашенных в результате реакции в розово-красный цвет, проводят определение экстинкции.

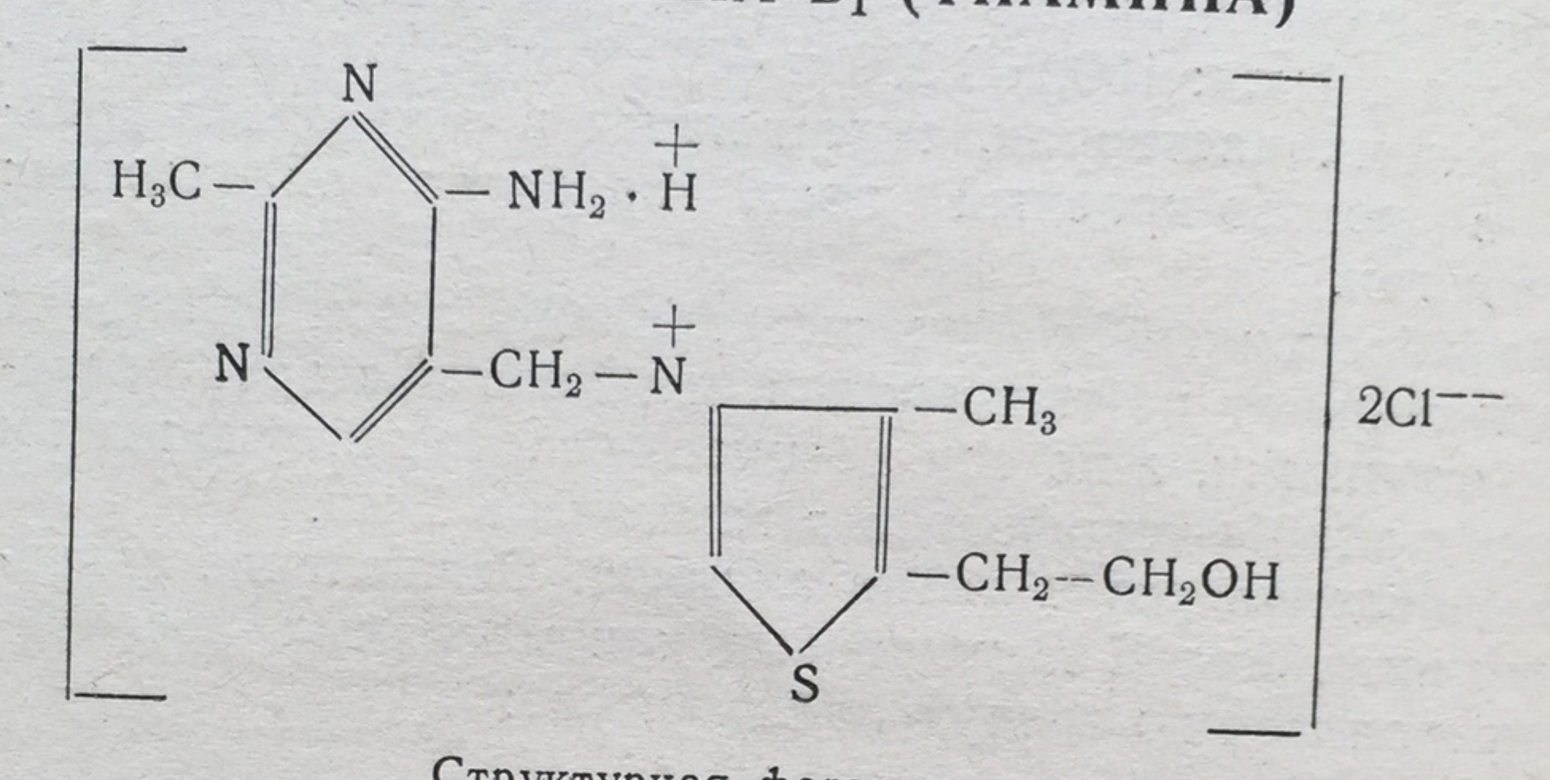
Калибровочный график вычерчивают путем нанесения по оси ординат найденных для каждого раствора значений экстинкции, а по оси абсцисс — соответствующих им концентраций α-токоферола в гаммах на 1 мл.

Вычисление результатов анализа. Вычисление содержания витамина Е в спиртовых или масляных препаратах проводится по следующей формуле:

$$x = \frac{c \cdot V \cdot d}{g \cdot 1000}, \qquad (18)$$

где x — количество витамина Е в 1 мл исследуемого препарата в миллиграммах; c — найденное по калибровочному графику количество витамина Е в 1 мл в гаммах; V — общий объем исследуемого раствора в миллилитрах (с учетом всех разведений); d — удельный вес исследуемых растворов; g — навеска препарата в граммах; 1000 — коэффициент для перевода числа гамм в миллиграммы.

ТИОХРОМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА B_1 (ТИАМИНА)



Структурная формула тиамина

Принцип метода

Тиамин в щелочной среде под действием красной кровяной соли количественно окисляется в тиохром, который, будучи извлечен из реакционной смеси изобутиловым спиртом, дает под действием ультрафиолетовых лучей сине-голубую флуоресценцию. Последнюю количественно определяют либо на флюорометре, либо на флюороскопе путем непосредственного визуального сравнения с растворами, в которых известно содержание тиамина.

Применимость метода

Метод применим к анализам препаратов и пищевых продуктов. При исследовании драже, таблеток, ампул ход анализа наиболее прост. Взятую навеску разводят до определенной концентрации, после чего проводят окисление тиамина в тиохром. Анализ пищевых продуктов осложняется необходимостью освобождения тиамина из связанного состояния.

Как известно, в большинстве природных источников тиамин встречается в виде пирофосфата (кокарбоксилазы). Последняя, являясь активной группой ряда ферментов углеводного обмена, находится в определенных связях с белком. Освобождение тиамина из связанного состояния осуществляется энзиматическим путем, воздействием пирофосфатаз и в ряде случаев протеолитических ферментов.

В качестве источника пирофосфатазы рекомендуется применять очищенные энзиматические препараты из плесеней Aspergillus oryzae.

Анализ затрудняется также наличием в ряде объектов примесей, обладающих флуоресценцией (обычно желто-зеленой). Эти примеси, маскируя флуоресценцию тиохрома, искажают результаты анализа флюорометрических измерений и делают невозможным применение флюороскопа без специальных обработок проб.

Удаление посторонних примесей достигается путем адсорбции и элюции в адсорбционных колонках. В качестве адсорбентов можно использовать некоторые глины (асканит), а также ионнообменные смолы (катионит СДВ-3). Многие объекты (молоко, мясо, картофель, белый хлеб и др.) содержат незначительные количества флуоресцирующих примесей, поэтому при исследовании их нет необходимости употреблять адсорбционные колонки. В этом случае примеси могут быть удалены отмывкой экстрактов из объектов бутиловым спиртом.

В зерновых культурах тиамин находится главным образом в свободном состоянии, но анализ этих объектов осложняется наличием в них крахмала, который, адсорбируя на себе тиамин, препятствует его количественному определению. Удаление крахмала достигается также в ходе ферментативного гидролиза воздействием амилаз, которыми богаты препараты из плесеней Aspergillus. Оптимумы pH пирофосфатазы и амилазы плесеней Aspergillus несколько различны, однако при pH=4,5 оба фермента достаточно активны.

Анализ объектов, богатых жиром, затруднен тем, что жир, переходя в бутиловые вытяжки, образует муть, мешающую измерению флуоресценции. Поэтому при исследовании объектов, богатых жиром, рекомендуется предварительно проводить обработку проб эфиром, так как тиамин нерастворим в эфире.

Все вышесказанное препятствует созданию единой методической прописи определения тиамина и заставляет нас дать несколько вариантов этого метода.

Аппаратура

1. Флюороскоп или флюорометры различных систем.
2. Потенциометр.
3. Термостат.
4. Центрифуга (емкость стаканов 50—100 мл).
5. Механическая качалка.
6. Печь тигельная.

Посуда

1. Бюретки со стеклянными кранами на 25 и 100 мл для отмеривания метилового и изобутилового спиртов (краны бюреток не смазывают, так как смазка содержит флуоресцирующие вещества).
2. Микробюретка на 2 мл.
3. Мерные колбы на 50, 100 и 1000 мл.
4. Центрифужные стаканчики с притертыми пробками на 50 мл для окисления тиамина в тиохром (окисление можно также проводить в цилиндрах и делительных воронках с притертыми пробками на 50 мл или в колбах с узким и длинным горлом на 100—200 мл).
5. Центрифужные стаканчики (без пробок) на 100 мл.
6. Делительные воронки с притертыми пробками на 50 и 100 мл.
7. Фарфоровые ступки диаметром 8—15 см.
8. Установка для перегонки спиртов. Состоит из круглодонной колбы на 2—3 л, дефлегматора, холодильника Либиха и приемной колбы. Применение резиновых соединительных трубок и резиновых пробок не допускается.
9. Пробирки из нефлуоресцирующего стекла (для визуальных измерений).
10. Адсорбционные колонки, состоящие из трех спаянных между собой концами трубок различного диаметра и длины. Верхняя часть колонки имеет длину 9 см и диаметр 2,5 см, средняя — длину 15 см и диаметр 0,7 см, нижняя состоит из капиллярной трубки длиной 3 см с внутренним диаметром 0,1 см.
11. Колбы плоскодонные, воронки, бюксы, тигли и другая общепринятая посуда химических лабораторий.

Реактивы, их очистка и приготовление растворов

1. Стандартный раствор тиамина. 100 мг тиаминхлорида, высушенного в эксикаторе над серной кислотой, растворяют в мерной колбе в 1000 мл дистиллированной воды (основной раствор тиамина). Раствор сохраняют на холоду в темном месте. Срок хранения 1—2 месяца.

2. 1% раствор красной кровяной соли (хранить в темном месте не более 2 дней).

3. 30% раствор едкого натра.

4. Окислительная смесь. К 2 мл 1% раствора красной кровяной соли прибавляют 10 мл 30% раствора едкого натра. Смесь пригодна к употреблению в течение 2—3 часов.

5. Метиловый спирт. Метиловый спирт обычно флуоресцирует, поэтому перед употреблением его нужно очищать. Очистку проводят путем перегонки при температуре 65° на водяной бане. При перегонке недопустимо употребление резиновых пробок и соединительных трубок.

6. Изобутиловый спирт с температурой кипения 108° (изобутиловый спирт можно заменить изоамиловым спиртом с температурой кипения 130° или бутиловым спиртом с температурой кипения 117°).

Перегонку изобутилового, изоамилового и бутилового спиртов ведут на глицериновой бане (при перегонке также не применяют резиновых пробок и трубок). Если путем перегонки не удается достаточно очистить спирты, их подвергают очистке активированным углем. Для этого к 1 л спирта прибавляют 10—15 г активированного угля, встряхивают в течение 10—15 минут, оставляют на сутки, повторяя встряхивание несколько раз, фильтруют и вновь перегоняют.

7. Этиловый спирт (ректификат).

8. 0,1 N раствор соляной кислоты.

9. 0,1% раствор соляной кислоты.

10. 3% раствор уксусной кислоты.

11. Насыщенный раствор бикарбоната натрия.

12. 25% раствор хлористого калия в 0,1 N растворе соляной кислоты.

13. 3% раствор аммиака в 70% растворе этилового спирта.

14. Буферные растворы:

0,1 М раствор уксуснокислого натрия,

0,1 М раствор уксусной кислоты.

Из них перед анализом изготовляют буферные растворы pH=3,8 и pH=4,5.

15. 0,1 N раствор азотнокислого серебра.

16. Раствор азотной кислоты: на 1 часть воды берут 1 часть азотной кислоты.

17. Калий углекислый (поташ).

18. Эфир серный.

19. Глицерин технический.

20. Дистиллированная вода. Дистиллированную воду перегоняют в аппарате из стекла. Вода, перегнанная в металлических кубах, интенсивно флуоресцирует, вследствие чего непригодна к употреблению.

21. Пепсин.

22. Очищенный энзиматический препарат из плесени Aspergillus oryzae является концентратом ряда ферментов. По внешнему виду представляет порошок песочного цвета. Препарат изготовляется в энзиматической лаборатории Всесоюзного научно-исследовательского института спиртовой и ликерно-водочной промышленности. Энзиматический препарат из плесени Aspergillus рекомендован для витаминологического анализа Государственным научно-исследовательским институтом витаминологии Министерства здравоохранения СССР. Препарат без заметной потери активности может сохраняться в течение 1—2 лет в сухом темном месте в склянке с притертой пробкой.

23. Адсорбент катионит СДВ-3 синтезирован в Московском химико-технологическом институте имени Д. И. Менделеева проф. И. П. Лосевым и А. С. Тевлиной. Рекомендован в качестве адсорбента тиамина витаминной лабораторией Института биохимии Академии наук СССР. Хранить его следует в склянке под слоем воды.

ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА В ПРЕПАРАТАХ

Для измерения флуоресценции употребляют флюорометры различных систем. При флюорометрических измерениях интенсивность флуоресценции выражается объективно, в отсчетах шкалы гальванометра. Флуоресценция

тиохрома измеряется в ультрафиолетовом свете со светофильтром, имеющим максимум пропускания 360 mμ.

Вторичные светофильтры, установленные перед фотоэлементами и предназначенные для изоляции флуоресценции тиохрома от флуоресценции различных примесей, содержащихся в объектах, имеют максимум пропускания около 470 mμ.

Подготовка материала к анализу

При анализе драже и таблеток взвешивают 30—50 штук и определяют средний вес одной штуки. Отобранную пробу тщательно растирают в ступке и из полученного порошка берут на аналитических весах две навески по 0,25—1 г (навески берут в зависимости от величины драже и содержания в нем витамина B_1). Навески растворяют в воде в мерных колбах на 100 мл (растворы $а_1$ и $а_2$). Из полученных растворов готовят растворы второго разведения так, чтобы содержание тиамина в них было примерно от 1 до 2γ в 1 мл (растворы $б_1$ и $б_2$).

Ход анализа

Приготовление эталона стандартного раствора тиохрома. В мерную колбу на 100 мл точно отмеривают калиброванной пипеткой 1 мл основного раствора тиамина, доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают (рабочий раствор). 1 мл такого раствора содержит 1 γ тиамина в 1 мл.

В три стаканчика для окисления отмеривают по 1 мл рабочего раствора тиамина, добавляют туда по 4 мл дистиллированной воды и по 2 мл метилового спирта. Последний добавляют для предохранения тиохрома от вредного влияния избытка красной кровяной соли. Пробы встряхивают в течение 1 минуты. Затем в два стаканчика для окисления прибавляют по 1,2 мл смеси красной кровяной соли и едкого натра, а в третий стаканчик — 1 мл 30% раствора едкого натра без феррицианида («слепая» проба). Стаканчики встряхивают в течение 2 минут. Туда же из бюретки прибавляют по 13 мл изобутилового или другого спирта из числа упомянутых (стр. 61, пункт 6) и энергично встряхивают в течение 3 минут для извлечения тиохрома в спирт. Водт-

ный и спиртовой слои разделяют или центрифугированием, или отстаиванием в делительных воронках, при этом делительные воронки помещают в темное место. Затем нижний водный слой удаляют (из центрифужных стаканчиков отсасывают пипеткой), а в верхний спиртовой слой добавляют 2 мл этилового спирта и оставляют растворы в темноте на несколько минут для просветления. После этого ими наполняют кюветы флюорометра и ставят в темное место до того, как будут проводиться измерения на аппарате.

Окисление тиамина в тиохром и измерение флуоресценции. Из полученных растворов драже второго разведения (растворы $б_1$ и $б_2$) берут от каждой пробы по 1 мл в три стаканчика для окисления. Дальнейший анализ проводится так же, как и при приготовлении эталонов стандартного раствора. После просветления этиловым спиртом изобутиловых вытяжек тиохрома ими наполняют кюветы флюорометра и проводят измерения на аппарате. Сначала измеряют интенсивность флуоресценции стандартного эталона и «слепой» пробы к нему, затем — проб испытуемого объекта с их «слепыми» пробами. Интенсивность флуоресценции выражается в отсчетах гальванометра.

Вычисление результатов анализа

Определение содержания тиамина производят по формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot b \cdot V \cdot V_2}{(d - d_1) \cdot a \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 10}, \qquad (19)$$

где x — количество тиамина в миллиграмм-процентах; $(c - c_1)$ — среднее из показаний флюорометра для испытуемого раствора минус среднее из показаний флюорометра для «слепой» пробы; $(d - d_1)$ — среднее из показаний флюорометра для стандартного раствора за вычетом среднего из показаний для «слепой» пробы; a — навеска в граммах; b — количество тиамина в 1 мл стандартного раствора в гаммах; V — объем жидкости, в которой растворена навеска, в миллилитрах (объем растворов a_1 и a_2); V_1 — количество раствора а и a_1, взятых для изготовления растворов второго разведения

(растворов $б_1$ и $б_2$), в миллилитрах; V_2 — конечный объем растворов $б_1$ и $б_2$ (растворов второго разведения); V_3 — количество растворов $б_1$ и $б_2$, взятых для окисления, в миллилитрах; 10 — коэффициент пересчета из гамм в миллиграмм-проценты.

Примечание. Препараты витамина B_1, получаемые промышленным путем, представляют из себя или хлориды (тиаминхлоридгидрохлорид) или бромиды (тиаминбромидгидробромид).

При анализе на содержание витамина B_1 этих препаратов необходимо устанавливать природу входящего в состав тиамина галоида, для чего проводят качественную реакцию с азотнокислым серебром. При наличии хлора выпадает белый осадок, при наличии брома — желтоватый. Драже и таблетки перед проведением качественной реакции необходимо озолять в присутствии углекислого калия. Если качественная реакция покажет наличие брома в молекуле тиамина, то при расчете в числитель формулы (19) вводят коэффициент 1,29.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_1 В ОБЪЕКТАХ, БОГАТЫХ СВЯЗАННОЙ ФОРМОЙ ТИАМИНА

Подготовка материала к анализу и ферментативная обработка проб

Мясо и мясные изделия, содержащие жир. Навеску мяса в 200 г пропускают через мясорубку и тщательно перемешивают. Из полученной однородной массы фарша берут на технохимических весах три навески по 5—10 г. Одну из навесок употребляют специально для установления pH среды. Взятые навески фарша переносят в ступки, заливают 25 мл серного эфира и растирают. Через 5—10 минут эфир сливают по палочке в делительные воронки, а навески заливают вторично таким же количеством эфира и оставляют еще на 5—10 минут. Эфирные вытяжки второй экстракции присоединяют к первой порции экстракта и добавляют туда по 50 мл 0,1 N раствора соляной кислоты. Делительные воронки встряхивают в течение 3 минут, после чего дают слоям разделиться[1]. Нижний водный слой из делительной воронки (раствор соляной кислоты) присоединяют к обезжиренной навеске и тщательно растирают. Кашицы

[1] Встряхивание эфирных вытяжек с раствором соляной кислоты проводят для того, чтобы извлечь из эфира и присоединить к навеске тот тиамин, который мог перейти вместе с жиром в эфир.

переводят (по палочке) в колбы, ступки смывают 10 мл 0,1 N раствора HCl, присоединяя эту жидкость к растертой в растворе соляной кислоты навеске фарша.

В дальнейшем анализ проводят по прописи, приведенной для объектов, бедных жиром.

Мясо и мясные изделия, бедные жиром. Если мясо тощее, то навески фарша сразу же растирают в ступках с 50 мл 0,1 N раствора соляной кислоты; содержимое ступок переводят в колбы, а ступки смывают 10 мл того же раствора и присоединяют эту жидкость к кашицам фарша. Затем в колбы с кашицами тощего или обезжиренного эфиром мяса добавляют по 200 мг пепсина, растертого в 10 мл 0,1% раствора HCl, и ставят их в термостат при 45° на 4—5 часов или при 37° на 6—7 часов. По истечении срока инкубации содержимое колб нейтрализуют насыщенным раствором бикарбоната натрия до pH = 3,8—4 (этот уровень pH устанавливают на гидролизате одной из колб). Затем отвешивают две навески по 50 мг энзиматического препарата Aspergillus, растирают в 7 мл ацетатной буферной смеси с pH = 3,8, добавляют 0,5 мл толуола и ставят в термостат при 45° (37°) на 12—16 часов. По истечении срока инкубации гидролизаты кипятят 5 минут с обратным воздушным холодильником, переводят в мерные колбы на 100 мл, доводят объем дистиллированной водой до метки и фильтруют. В фильтрате производят определение тиамина тиохромным методом, предварительно освобождая его от флуоресцирующих примесей по способу, описанному ниже.

Молоко. Отмеривают цилиндром 50—100 мл молока и подвергают его обезжириванию центрифугированием. Обезжиренное молоко переводят в тот же цилиндр и доводят объем водой до первоначального. Молоко взбалтывают, берут пипеткой по 15—30 мл в три колбы и подкисляют концентрированным раствором соляной кислоты до pH = 1,5—2 (для коровьего молока на 30 мл идет 0,3—0,4 мл HCl). Отвешивают на аналитических или торзионных весах три навески по 50—100 мг пепсина (в зависимости от количества молока), растирают его в ступках с 10 мл 0,1% раствора HCl и присоединяют к пробам с подкисленным молоком. Колбы ставят в термостат при 45° на 4—5 часов или при 37° на 6—7 часов. Пепсиновые гидролизаты нейтрализуют насыщенным

раствором бикарбоната натрия до pH = 3,8—4, количество необходимого для нейтрализации бикарбоната натрия устанавливают в гидролизате одной из колб, которая употребляется специально для этой цели. Затем берут две навески по 50 мг препарата из плесени Aspergillus, растирают в ступках с 7 мл буферной смеси с pH = 3,8, присоединяют к пепсиновому гидролизату и добавляют 0,5 мл толуола. Колбы ставят в термостат при 45° или 37° на 12—16 часов. По истечении срока инкубации гидролизаты кипятят с обратным воздушным холодильником, переводят в мерные колбы на 50 мл, доводят объем дистиллированной водой до метки и фильтруют. В фильтрате производят определение тиамина тиохромным методом, предварительно освобождая его от флуоресцирующих примесей по способу, описанному ниже.

Ход анализа[1]

Освобождение фильтратов от примесей, обладающих флуоресценцией. При исследовании мяса и особенно молока освобождение от примесей, обладающих флуоресценцией, можно проводить, не прибегая к адсорбционным колонкам, путем встряхивания фильтратов с изобутиловым или бутиловым спиртом.

Для этого в две делительные воронки вводят по 25 мл фильтрата от каждой навески, добавляют туда равный объем изобутилового спирта, сильно встряхивают в течение 3 минут и дают слоям разделиться.

После разделения нижний водный слой переводят в цилиндры и доводят объем до первоначального (до 25 мл)[2].

Окисление тиамина в тиохром. Окисление тиамина в тиохром проводят так, как это было описано на стр. 64 с тем различием, что количество фильтрата берут 5 мл и воды не добавляют. Только для некоторых объектов (например, для свинины) количество фильтрата берут менее 5 мл.

---

[1] Приготовление стандартного эталона тиохрома проводят так, как было описано на стр. 63.

[2] При встряхивании с изобутиловым спиртом некоторая часть воды фильтрата переходит в изобутиловый спирт, вследствие чего объем фильтрата несколько уменьшается, поэтому его следует довести водой до первоначального.

Вычисление результатов анализа

Содержание тиамина вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot b \cdot V}{(d - d_1) \cdot a \cdot V_3} \cdot 10, \qquad (20)$$

где x — количество тиамина в миллиграмм-процентах; $(c - c_1)$ — среднее из показаний флюорометра для испытуемого раствора минус среднее из показаний флюорометра для «слепой» пробы; $(d - d_1)$ — среднее из показаний флюорометра для стандартного раствора минус среднее из показаний флюорометра для «слепой» пробы; b — количество тиамина в 1 мл стандартного раствора в гаммах; a — навеска в граммах; V — объем жидкости, в которой растворена навеска; V_3 — объем жидкости, взятой для окисления, в миллилитрах; 10 — коэффициент пересчета из гамма в миллиграмм-проценты.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_1 В ОБЪЕКТАХ, СОДЕРЖАЩИХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ПРИМЕСИ

Бутиловые вытяжки тиохрома, которые окрашены в темные цвета, при просмотре в ультрафиолетовом свете обладают желто-зеленой флуоресценцией, маскирующей флуоресценцию тиохрома.

Особенно богаты такими примесями зерновые и продукты их переработки (мука ржаная, мука пшеничная грубого помола, отруби, гречневая крупа, бобовые и ряд других объектов). Значительные количества флуоресцирующих примесей содержат жареное мясо и печень.

При исследовании этих объектов отмывка фильтратов изобутиловым спиртом является недостаточно радикальным средством, поэтому в этих случаях прибегают к адсорбционным колонкам. Работа с последними изложена на стр. 69—70.

Подготовка материала к анализу и ферментативная обработка проб

Зерновые объекты. Три навески по 5—10 г от средней пробы исследуемого объекта тщательно растирают в фарфоровых ступках с 70 мл 0,1 N раствора соляной

кислоты. Содержимое ступок переводят в колбы, а ступки споласкивают 15 мл того же раствора соляной кислоты и присоединяют эту жидкость к исходным навескам объекта. Колбы выдерживают на кипящей водяной бане в течение 45 минут, время от времени перемешивая их содержимое палочкой, затем охлаждают, добавляют насыщенный раствор бикарбоната натрия до pH=4,5. Количество бикарбоната, необходимое для нейтрализации, устанавливают на содержимом третьей колбы. Затем в две первые колбы добавляют по 50 мг препарата Aspergillus, растертого в 10 мл буферной смеси с pH около 4,5 и по 0,5 мл толуола. Колбы ставят в термостат при 45° (37°) на 12—16 часов.

По истечении срока инкубации колбы охлаждают, содержимое их переводят в цилиндры, доводят объем жидкости водой до 50—100 мл и фильтруют, после чего освобождают фильтрат от флуоресцирующих примесей по способу, описанному ниже.

Мясо жареное и печень. При исследовании этих объектов ферментативный гидролиз проводят так, как описано для сырого мяса, а освобождение от флуоресцирующих примесей — по способу, который изложен ниже.

Ход анализа

Приготовление стандартного раствора тиохрома. В мерную колбу на 100 мл точно отмеривают калиброванной пипеткой 1 мл основного раствора тиамина (стр. 61), доводят дистиллированной водой до метки и тщательно перемешивают (рабочий раствор). В три стаканчика для окисления отмеривают по 1 мл рабочего раствора тиамина, добавляют туда по 4 мл 25% раствора KCl в 0,1 N растворе HCl. В остальном окисление проводят так, как это было описано на стр. 63—64.

Освобождение фильтратов от примесей, обладающих флуоресценцией[1]. Адсорбционная колонка представляет собой трубку, спаянную из трех трубочек различного диаметра и длины. В нижнюю часть второй трубки — там, где она переходит в капилляр, помещают комочек

---

[1] Раздел составлен по материалам работ Витаминной лаборатории Института биохимии АМН СССР, опубликованным в сборнике «Витаминные ресурсы и их использование», вып. 3-й, 1955.

стеклянной ваты и над ним, в средней части колонки,— адсорбент. Высота столбика для катионита СДВ-3 должна быть 8 см.

Перед пропусканием фильтрата через колонку с адсорбентом пропускают 20 мл 3% раствора уксусной кислоты, нагретой до 60—70°. Затем в две адсорбционные колонки вводят от каждой навески по 20 мл фильтрата. После того как весь фильтрат пройдет через колонки (насосом пользоваться не следует), адсорбент промывают 2—3 раза 10 мл дистиллированной воды.

Элюция тиамина с адсорбента осуществляется горячим 25% раствором KCl в 0,1 N растворе HCl. Для этого в две колбы отмеривают по 30 мл элюирующей жидкости, подогревают ее до 60—80° и пропускают через колонки порциями по 5—6 мл (элюирующую жидкость приходится подогревать несколько раз). Элюат собирают в мерные цилиндры, причем объем его должен быть 30 мл. Если он несколько меньше, так как вода частично испаряется при нагревании, то объем доводят водой до первоначального [1].

Окисление тиамина в тиохром. Окисление тиамина в тиохром проводят так, как это было описано в разделе по определению витамина B_1 в препаратах, с тем различием, что для окисления берут по 5 мл элюата.

Вычисление результатов анализа

В случае адсорбционной модификации флюорометрического метода расчеты проводят по следующей формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot b \cdot V \cdot n}{(d - d_1) \cdot a \cdot V_3 \cdot m \cdot 10}, \qquad (21)$$

где x — содержание тиамина в миллиграмм-процентах;

---

[1] По окончании адсорбции через адсорбционные колонки пропускают сперва дистиллированную воду (20—30 мл), затем 30 мл доведенного до кипения спиртового раствора аммиака (3% аммиака в 70% этиловом спирте), после чего пропускают еще раз воду и перед повторным употреблением 3% раствор уксусной кислоты (регенерация катионита).

n — количество элюата в миллилитрах; m — количество фильтрата, взятого для адсорбции, в миллилитрах; остальные обозначения те же, что и в формуле (20).

ФЛЮОРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИАМИНА В ПРЕПАРАТАХ И ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Для возбуждения флуоресценции служит ртутно-кварцевая лампа ПРК-2 или ПРК-4, помещенная в металлический кожух. Кожух имеет прорезь, закрытую фильтром, с максимумом пропускания длины волн 360 mμ.

Содержание тиамина определяется путем глазомерного сравнения в ультрафиолетовом свете флуоресценции опытной пробы с эталонами стандартной шкалы тиохрома.

Поскольку при флюороскопическом методе измерения проводятся визуально, необходимо изготовлять не один, а целый ряд стандартных эталонов тиохрома, с которыми проводят сравнение опытных проб.

Подготовка материала к анализу

При определении тиамина в препаратах и пищевых продуктах подготовку материала проводят так, как это было описано для флюорометрического метода.

Ход анализа

Приготовление шкалы стандартных растворов. Стандартную шкалу изготовляют из основного раствора тиамина путем разведения последнего дистиллированной водой в мерных колбах на 100 мл (табл. 4). Техника приготовления основного раствора описана на стр. 61.

Из стандартных растворов различной концентрации отмеривают пипеткой по 1 мл и переносят в центрифужные стаканчики с притертыми пробками или другую посуду для окисления (пользоваться можно одной и той же пипеткой, если идти от слабых растворов к более концентрированным). Добавляют туда по 4 мл дистиллированной воды, 2 мл метилового спирта и проводят окисление тиамина в тиохром так, как это было описано при окислении стандартного эталона при флюорометри-

Таблица 4

Приготовление стандартной шкалы

№ стандартного раствора	Количество основного раствора в мл	Количество добавленной воды в мл	Содержание тиамина в 1 мл полученного раствора в γ
1	0,1	До 100	0,1
2	0,2	„ 100	0,2
3	0,3	„ 100	0,3
4	0,4	„ 100	0,4
5	0,5	„ 100	0,5
6	0,6	„ 100	0,6
7	0,7	„ 100	0,7
8	0.8	„ 100	0,8
9	0,9	„ 100	0,9
10	1,0	„ 100	1,0
11	1,2	„ 100	1,2
12	1,4	„ 100	1,4
13	1,6	„ 100	1,6
14	1,8	„ 100	1,8
15	2,0	„ 100	2,0

ческом методе, с тем различием, что в данном случае «слепой» пробы для эталонов шкалы не изготовляют.

Стандартные растворы тиохрома хранят в темноте не более 2 дней.

Примечание. Не во всех случаях необходимо изготовлять стандартную шкалу из всех 15 эталонов. Обычно в ходе работы становится ясно, что для исследуемой группы объектов можно изготовлять шкалу с более узким диапазоном эталонов.

Измерение флуоресценции. После просветления изобутиловых вытяжек тиохрома из каждой пробы стандартных и опытных проб отбирают по 10 мл и переносят в пробирки для измерения флуоресценции.

Интенсивность флуоресценции измеряют следующим образом. Пробирки с испытуемым раствором помещают в штатив, наглухо прикрепленный к кожуху аппарата перед увиолевым светофильтром, устанавливают его под углом в 60° и сравнивают между собой в ультрафиолетовом свете флуоресценцию параллельных опытных проб. Если подметить разницы в интенсивности их флуоресценции не удается, то в штативе оставляют одну из проб и по обеим ее сторонам помещают эталоны стандартной

шкалы, меняя их до тех пор, пока не удастся подобрать равный по интенсивности флуоресценции эталон. Если флуоресценция испытуемой пробы окажется слабее одного из стандартных эталонов и сильнее другого, то для расчетов берут среднюю величину между двумя стандартными эталонами.

В том случае, если параллельные пробы с испытуемым раствором будут несколько отличаться по интенсивности флуоресценции, то к каждой из них подбирают отдельные эталоны стандартной шкалы и устанавливают среднюю величину между этими измерениями.

Вычисление результатов анализа

Содержание витамина B_1 в драже и таблетках рассчитывают по следующей формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot V \cdot V_2}{a \cdot V_1 \cdot V_3 \cdot 10}, \qquad (22)$$

где x — количество витамина B_1 в миллиграмм-процентах; c — количество тиамина в 1 мл стандартного раствора, флуоресценция которого совпадает с флуоресценцией испытуемого раствора, в гаммах; c_1 — количество витамина B_1 в 1 мл стандартного раствора, флуоресценция которого совпадает с флуоресценцией «слепой» пробы, в гаммах; a — навеска в граммах; V — объем жидкости, в которой растворена навеска (растворы a_1 и a_2), в миллилитрах; V_1 — количество растворов $а_1$ и $а_2$, взятых для изготовления растворов второго разведения (растворов $б_1$ и $б_2$), в миллилитрах; V_2 — конечный объем растворов $в_1$ и $в_2$ в миллилитрах; V_3 — количество растворов $б_1$ и $б_2$, взятых для окисления, в миллилитрах; 10 — коэффициент пересчета из гамм в миллиграмм-проценты.

Расчет на одну штуку препарата драже или таблеток производится по формуле:

$$R = \frac{x \cdot d}{100}, \qquad (22а)$$

где R — содержание витамина B_1 в одной штуке драже таблеток в миллиграммах; x — содержание витамина B_1 в миллиграмм-процентах; d — вес одной штуки драже.

Содержание витамина B_1 в объектах при анализе без адсорбционной модификации флюороскопического метода рассчитывается по следующей формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot V}{a \cdot V_3 \cdot 10}, \qquad (23)$$

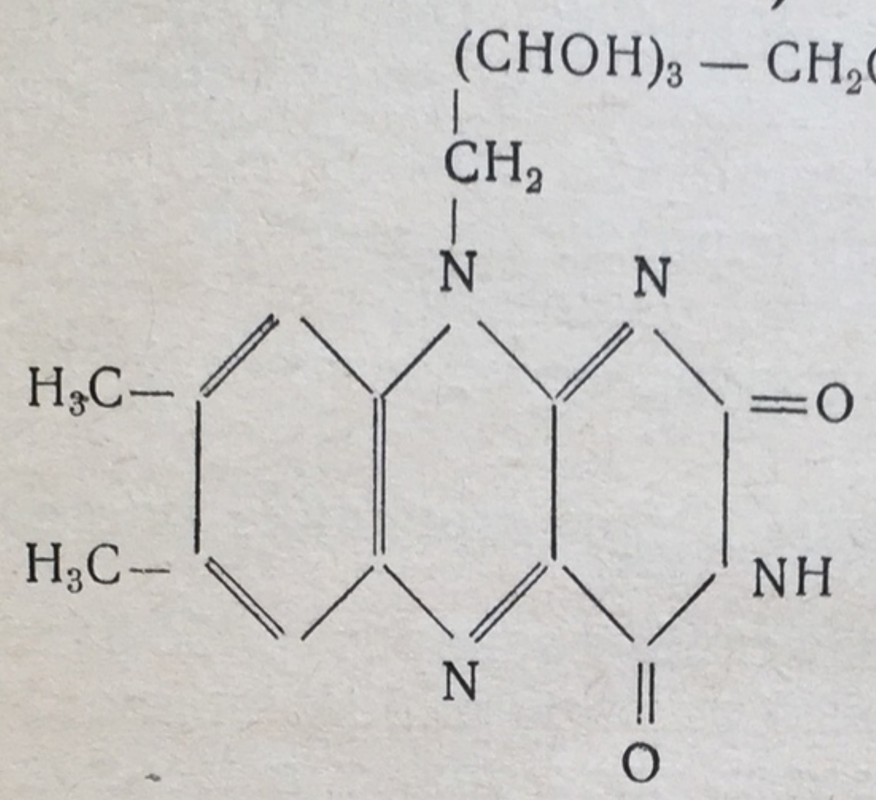
где x — количество витамина B_1 в миллиграмм-процентах; остальные обозначения те же, что и в формуле (22).

В случае адсорбционной модификации флюороскопического метода расчет проводят по формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot V \cdot n}{a \cdot V_3 \cdot m \cdot 10}, \qquad (24)$$

где x — количество витамина B_1 в миллиграмм-процентах; n — объем элюата (30 мл) в миллилитрах; m — объем фильтрата, взятого для адсорбции, в миллилитрах; остальные обозначения те же, что и в формуле (22).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА B_2 (РИБОФЛАВИНА)



Структурная формула рибофлавина

Водные растворы рибофлавина имеют желтую окраску и обладают в ультрафиолетовом свете желто-зеленой флуоресценцией. На этих свойствах основаны методы определения рибофлавина.

ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В ПРЕПАРАТАХ

Принцип метода

Под действием щелочей рибофлавин восстанавливается и переходит в нефлуоресцирующий в водном растворе лейкофлавин. Измерив на флюорометре величину флуоресценции испытуемого раствора и величину флуоресценции этого же раствора после перевода рибофлавина в лейкофлавин, определяют по разности содержание рибофлавина в испытуемом растворе.

Применимость метода

Метод применим для определения рибофлавина в препаратах, не содержащих других, кроме рибофлавина, флуоресцирующих веществ.

Аппаратура

1. Флюорометр.
2. Весы аналитические.
3. Весы технохимические.
4. Разновесы.

Посуда

1. Колбы мерные на 50, 100, 500 и 1000 мл.
2. Колбы конические на 100 и 300 мл.
3. Воронки диаметром 10—15 см.
4. Ступки фарфоровые диаметром 10—15 см.
5. Бюксы разных размеров.
6. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.

Реактивы и приготовление растворов

1. Кристаллический препарат рибофлавина.

2. Стандартный раствор рибофлавина: 50 мг кристаллического препарата растворяют в мерной колбе на 1 л в горячей воде и после охлаждения доводят до метки. 1 мл этого раствора содержит 50 γ рибофлавина. Раствор хранят в темноте на холоду в течение месяца. Перед анализом приготовляют рабочий раствор, для чего 0,4 мл стандартного раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки водой.

Рабочий раствор содержит 0,2 γ рибофлавина в 1 мл.

3. Водный 1 N раствор едкого натра.
4. Водный 1 N раствор серной кислоты.

Ход анализа

При анализе драже и таблеток из средней пробы берут 30—50 штук, взвешивают и определяют вес одной штуки. Отобранную пробу тщательно растирают и из хорошо перемешанной массы берут на аналитических весах две параллельные навески около 1 г каждая. Навески растворяют в горячей воде в мерной колбе емкостью 100 мл и после охлаждения доводят водой до метки. При наличии мути раствор фильтруют.

Из полученного раствора приготовляют путем вторичного разведения рабочие растворы с таким расчетом, чтобы в 1 мл конечного раствора содержание рибо-

флавина было близко к содержанию его в 1 мл рабочего стандартного раствора (около 0,2 γ). При анализе драже весом 0,25 г при содержании в нем 2 мг витамина B_2 0,25 мл первого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. При анализе драже весом в 1 г с содержанием 2 мг витамина B_2 1 мл основного раствора вносят в колбу на 100 мл. При анализе драже весом в 1 г с содержанием 1 мг витамина B_2 (поливитаминное драже) 2 мл основного раствора вносят в колбу на 100 мл. Полученные растворы наливают в кюветы флюорометра и помещают до определения в темноту. Одновременно приготовляют раствор для «слепого» опыта к стандартному и испытуемому растворам. Для этого из рабочего стандартного и испытуемого растворов берут по 25 мл, добавляют в каждую по 0,3 мл водного 1 N раствора NaOH, перемешивают и оставляют стоять при комнатной температуре 10 минут; после этого растворы наливают в кюветы флюорометра. Интенсивность флуоресценции стандартного и испытуемого растворов, а также растворов «слепого» опыта измеряют на флюорометре.

Вычисление результатов анализа

Содержание рибофлавина в испытуемом препарате, а также в одной штуке вычисляют по формулам:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot m \cdot V \cdot V_1 \cdot 100}{(n - n_1) \cdot g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (25)$$

$$x_1 = \frac{(c - c_1) \cdot m \cdot V \cdot V_1 \cdot P}{(n - n_1) \cdot g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (26)$$

где x — содержание рибофлавина в исследуемом препарате в миллиграмм-процентах; x_1 — содержание рибофлавина в одной штуке драже в миллиграммах; c — показания шкалы флюорометра для испытуемого раствора; c_1 — показания шкалы флюорометра для «слепого» опыта к испытуемому раствору (после гашения флуоресценции); m — содержание рибофлавина в 1 мл стандартного раствора в гаммах; n — показания шкалы флюорометра для стандартного раствора; n_1 — показания шкалы флюорометра для «слепого» опыта стан-

дартного раствора (после гашения флуоресценции); V — объем раствора, в котором растворена навеска, в миллилитрах; V_1 — объем рабочего испытуемого раствора (после второго разведения) в миллилитрах; V_2 — объем раствора, взятого для приготовления рабочего испытуемого раствора, в миллилитрах; g — навеска в граммах; P — вес одной штуки драже в граммах; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы; 100 — коэффициент пересчета в проценты.

ФЛЮОРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В ПРЕПАРАТАХ

Принцип метода

При кипячении со щелочью рибофлавин в растворе разрушается необратимо, и зависящая от него флуоресценция пропадает. К испытуемому раствору рибофлавина после его разрушения указанным способом прибавляют под контролем флюороскопа стандартный раствор рибофлавина до тех пор, пока интенсивность флуоресценции не достигнет таковой исходного испытуемого раствора. По количеству израсходованного при этом стандартного раствора рибофлавина определяют содержание его в испытуемом растворе.

Применимость метода

Метод применим для определения рибофлавина в препаратах, не содержащих, кроме рибофлавина, других флуоресцирующих веществ.

Аппаратура

1. Флюороскоп — ртутно-кварцевая лампа ПРК-2 или ПРК-4, помещенная в кожух с черным никелевым светофильтром (стекло Вуда) и набором пробирок одинакового диаметра из однородного нефлуоресцирующего стекла.
2. Весы аналитические.
3. Весы технохимические.
4. Разновесы.

Посуда

1. Колбы мерные на 50, 100, 500 и 1000 мл.
2. Колбы конические на 100 и 300 мл.
3. Воронки диаметром 10—15 см.
4. Ступки фарфоровые диаметром 12—15 см.
5. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.
6. Микробюретки на 2 и 5 мл.

Реактивы и приготовление растворов

1. Рибофлавин кристаллический.

2. Стандартный раствор рибофлавина: 50 мг кристаллического препарата растворяют в мерной колбе на 1 л в горячей воде и после охлаждения доводят до метки. 1 мл этого раствора содержит 50 γ рибофлавина (раствор хранят в темноте на холоду в течение месяца). Перед анализом приготовляют рабочий раствор, для чего 0,4 мл основного стандартного раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят до метки водой. Рабочий раствор содержит 0,2 γ рибофлавина в 1 мл.

3. Водный 1 N раствор едкого натра.

4. Водный 1 N раствор серной кислоты.

Ход анализа

При анализе драже и таблеток берут до 50 штук, взвешивают и определяют вес одной штуки. Отобранную пробу тщательно растирают и из перемешанной массы берут на аналитических весах две параллельные навески, около 0,5 г каждая. Навески растворяют в горячей воде в мерных колбах на 100 мл и после охлаждения доводят водой до метки. При наличии мути раствор фильтруют.

Из полученного раствора приготовляют путем вторичного разведения рабочие растворы с таким расчетом, чтобы в 1 мл конечного раствора содержание рибофлавина было близко к содержанию его в 1 мл рабочего стандартного раствора (около 0,2 γ).

При анализе драже весом в 1 г с содержанием 2 мг витамина B_2 в одной штуке для второго разведения берут 1 мл раствора и вносят в колбу на 50 мл. При анализе драже весом 0,25 г с содержанием 2 мг витамина B_2 берут 0,5 мл в колбу на 100 мл. При анализе

драже весом в 1 г с содержанием 1 мг витамина B_2 берут 2 мл первого раствора в колбу на 50 мл.

Из приготовленных указанным способом рабочих растворов берут точно по 10 мл в пробирки флюороскопа, закрывают ватной пробкой и до начала определения флуоресценции защищают от яркого света.

Одновременно приготовляют растворы «слепого» опыта. Для этого из каждого рабочего раствора в колбы берут по 25 мл, в каждую добавляют по 0,3 мл 1 N водного раствора NaOH, отмечают объем и, тщательно перемешав, кипятят на слабом огне в течение 5 минут. После охлаждения объем доводят дистиллированной водой до исходного и прибавляют в каждую колбу по 0,3 мл 1 N раствора H_2SO_4; pH раствора доводят до 6—6,8 (максимальная интенсивность флуоресценции рибофлавина).

Из каждой колбы с раствором «слепого» опыта берут по 10 мл в пробирки флюороскопа и проводят уравнение флуоресценции «слепого» опыта с флуоресценцией испытуемого раствора. Для этого к раствору «слепого» опыта прибавляют по каплям из микробюретки стандартный рабочий раствор до тех пор, пока интенсивность флуоресценции раствора «слепого» опыта не сравняется с интенсивностью флуоресценции испытуемого раствора.

Уравнивание флуоресценции проводят в остальных пробирках «слепого» опыта и из полученных результатов берут среднюю величину.

Вычисление результатов анализа

Содержание рибофлавина в исследуемом препарате, а также в одной штуке драже вычисляют по формулам:

$$x = \frac{m \cdot k \cdot V \cdot V_1 \cdot 100}{g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (27)$$

$$x_1 = \frac{m \cdot k \cdot V \cdot V_1 \cdot P}{g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (28)$$

где x — содержание рибофлавина в препарате в миллиграмм-процентах; x_1 — содержание рибофлавина в одной штуке драже в миллиграммах; m — содержание рибофлавина в 1 мл рабочего стандартного раствора в гам-

мах; k — количество стандартного раствора, добавленного к раствору «слепого» опыта, в миллилитрах; V — объем основного раствора, в котором растворена навеска, в миллилитрах; V_1 — объем рабочего испытуемого раствора в миллилитрах; V_2 — объем основного раствора, взятого для приготовления рабочего раствора, в миллилитрах; g — навеска в граммах; P — вес одной штуки драже в граммах; 100— коэффициент пересчета в проценты; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы.

КОЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ И ДРАЖЕ С ВИТАМИНОМ B_2 [1]

Принцип метода

Метод основан на сравнении окраски испытуемого раствора со стандартным в колориметре.

Применимость метода

Метод применим для объектов, не содержащих, кроме рибофлавина, других окрашенных веществ.

Аппаратура

1. Колориметр типа Дюбоска или электрофотоколориметр.
2. Весы аналитические.
3. Весы технохимические.
4. Разновесы.

Посуда

1. Колбы мерные на 50, 100, 250, 500 и 1000 мл.
2. Колбы конические на 100 и 300 мл.
3. Цилиндры мерные на 50 и 100 мл.
4. Воронки диаметром 5—10 см.
5. Ступки фарфоровые диаметром 10—15 см.
6. Бюксы разных размеров.
7. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.

---

[1] Разработан во ВНИВИ.

Реактивы

1. Рибофлавин кристаллический (чистота проверяется по температуре плавления).

2. Стандартный раствор рибофлавина: 50 мг кристаллического рибофлавина, взятые на аналитических весах, растворяют в горячей дистиллированной воде в мерной колбе на 1000 мл и после охлаждения доводят до метки. 1 мл этого раствора содержит 50 γ рибофлавина. Раствор устойчив на холоду и в темноте в течение месяца. Перед анализом приготовляют рабочий раствор, для чего 10 мл основного стандартного раствора вносят в мерную колбу на 50—100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. 1 мл рабочего стандартного раствора содержит соответственно 10—5 γ рибофлавина (растворы защищать от света).

Ход анализа

При анализе кристаллического препарата из тщательно перемешанного порошка исследуемого рибофлавина отвешивают на аналитических весах две навески по 50 мг и каждую из них растворяют в горячей дистиллированной воде в мерной колбе на 1000 мл. Из полученного раствора приготовляют путем разведения рабочий раствор с таким расчетом, чтобы концентрация его приблизительно совпадала с концентрацией применяемого стандартного раствора. Для этого 25 мл основного испытуемого раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки (защищать от света!). Интенсивность окраски испытуемого рабочего раствора измеряют в колориметре типа Дюбоска, сравнивая со стандартным раствором рибофлавина, или в электрофотоколориметре, пользуясь калибровочным графиком. Для составления графика по оси ординат откладывают значения экстинкции точных растворов различных последовательных концентраций кристаллического рибофлавина, а по оси абсцисс — соответствующие им количества рибофлавина в гаммах в 1 мл раствора.

При анализе драже с витамином B_2 из растертой и перемешанной пробы материала (30—50 штук) берут навеску в 1 г и растворяют ее в горячей воде в мерной колбе на 100 мл и после охлаждения доводят до метки.

Из полученного раствора путем вторичного разведения получают рабочие растворы. В случае драже весом в 1 г с содержанием витамина 2 мг в 1 штуке берут 10 мл первоначального раствора в мерную колбу на 50 мл и доводят до метки водой. В случае драже весом в 0,25 г с содержанием витамина 2 мг в 1 штуке берут 5 мл первоначального раствора в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки. Раствор фильтруют и интенсивность окраски измеряют в колориметре типа Дюбоска или в электрофотоколориметре.

Вычисление результатов анализа

Содержание рибофлавина в кристаллических препаратах вычисляют по следующим формулам.

При использовании колориметра типа Дюбоска:

$$x = \frac{c \cdot n_1 \cdot V}{n_2 \cdot g \cdot V_2} \cdot \frac{V_1 \cdot 100}{1000 \cdot 1000}, \qquad (29)$$

где x — содержание рибофлавина в кристаллическом препарате в миллиграмм-процентах; c — количество рибофлавина в 1 мл стандартного рабочего раствора в гаммах; n_1 — высота столба стандартного раствора в миллиметрах; n_2 — высота столба испытуемого раствора в миллиметрах; V — объем раствора, в котором растворена навеска (первое разведение), в миллилитрах; V_1 — конечный объем рабочего испытуемого раствора (второе разведение) в миллилитрах; V_2 — объем основного раствора, взятого для приготовления рабочего раствора, в миллилитрах; g — навеска в граммах; 100 — коэффициент пересчета в проценты; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы; 1000 — коэффициент пересчета в граммы.

При использовании электрофотоколориметра:

$$x = \frac{n \cdot V \cdot V_1 \cdot 100}{g \cdot V_2 \cdot 1000 \cdot 1000}, \qquad (30)$$

где x — содержание рибофлавина в кристаллическом препарате в миллиграмм-процентах; n — содержание рибофлавина в 1 мл испытуемого раствора, найденное по калибровочной кривой, в гаммах; остальные обозначения те же, что и в формуле (29).

Содержание рибофлавина в драже вычисляют по следующим формулам.

При использовании колориметра типа Дюбоска:

$$x = \frac{c \cdot n \cdot V \cdot V_1 \cdot P}{n_2 \cdot g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (31)$$

где x — содержание рибофлавина в одной штуке драже в миллиграммах; P — средний вес драже в граммах; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы; остальные обозначения те же, что и в формуле (29).

При использовании электрофотоколориметра:

$$x = \frac{n \cdot V \cdot V_1 \cdot P}{g \cdot V_2 \cdot 1000}, \qquad (32)$$

где x — содержание рибофлавина в одной штуке драже в миллиграммах; остальные обозначения те же, что и в формулах (29) и (31).

ФЛЮОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ РИБОФЛАВИНА В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И ДРУГИХ ОБЪЕКТАХ[1]

Принцип метода

Витамин B_2 (рибофлавин) в естественных продуктах находится в свободном и связанном состоянии.

Формы, связанные с белком, не флуоресцируют в ультрафиолетовом свете, и поэтому для определения общего содержания рибофлавина (свободного и связанного) необходимо провести освобождение рибофлавина из его связанных форм. Для разрыва связи применяют кислотный гидролиз и обработку ферментативными препаратами, обладающими фосфатазной активностью, а также протеолитическими ферментами типа трипсина при соответствующей величине pH растворов.

Применимость метода

Метод применим для определения рибофлавина в пищевых продуктах, а также в животных и растительных тканях.

---

[1] Разработан в Институте биохимии АН СССР.

Аппаратура

1. Флюорометр с чувствительным гальванометром, специфичными светофильтрами и кюветами.
2. Качалка механическая.
3. Центрифуга со стаканами на 50 и 100 мл.
4. Термостат.
5. Потенциометр.
6. Водяная баня.

Посуда

1. Ступки фарфоровые диаметром 5—10 и 15—20 см.
2. Колбы мерные на 100, 250, 500 и 1000 мл.
3. Колбы конические на 100, 300 и 500 мл.
4. Цилиндры мерные на 25, 50, 100 и 250 мл.
5. Бюксы разных размеров.
6. Воронки диаметром 10—12 см.
7. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.

Реактивы и приготовление растворов

1. Стандартный раствор рибофлавина: готовится путем растворения в дистиллированной воде 20 мг рибофлавина в мерной колбе на 500 мл (1 мл такого раствора содержит 40 γ рибофлавина). Раствор стоек в течение месяца при хранении в темноте на холоду. Перед анализом приготовляют рабочий раствор, для чего 0,5—1 мл стандартного основного раствора вносят в мерную колбу на 100 мл и доводят водой до метки (1 мл рабочего раствора содержит соответственно 0,2—0,4 γ рибофлавина).

2. Серная кислота х. ч., 0,1 N раствор.

3. Фосфатный буфер с pH=7,8—8.

Приготовляют 1/15 М раствор фосфорнокислого натрия двузамещенного ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$), для чего 11,876 г его растворяют в 1 л дистиллированной воды, и 1/15 М раствор фосфорнокислого калия однозамещенного (KH_2PO_4), для чего 9,078 г его растворяют в 1 л воды. На 95 частей первого раствора прибавляют 5 мл второго. pH буферной смеси проверяют потенциометрически.

4. Калий марганцовокислый ($KMnO_4$), 4% раствор. Раствор хранят не более 2 недель в посуде из темного стекла.

5. Перекись водорода (H_2O_2), 3% раствор.

6. Хлористое олово ($SnCl_2$). 10 г $SnCl_2$ растворяют в 25 мл концентрированной соляной кислоты. Раствор хранят в темной склянке с притертой пробкой. Из полученного таким образом основного раствора перед анализом приготовляют каждый раз рабочий раствор, для чего 0,5 мл основного раствора разбавляют водой до 100 мл.

7. Гидросульфит натрия ($Na_2S_2O_4 \cdot 2H_2O$). Перед анализом приготовляют раствор, для чего 0,25 г растворяют в 10 мл 2% раствора двууглекислого натрия ($NaHCO_3$).

8. Ферментные препараты: трипсин или панкреатин; препарат из мицелия Penicillium или очищенный энзиматический препарат Aspergillus [1].

При внесении в вытяжку исследуемого вещества ферментный препарат предварительно растирают в ступке с 5—10 мл буферного раствора [2].

Ход анализа

Навеску материала 5—10 г тщательно растирают в ступке с небольшим количеством фосфатного буфера с pH=7,8—8. Растертую массу переносят в колбу с добавлением того же буферного раствора, которым смывают несколько раз ступку, до объема приблизительно 1 : 20 и выдерживают в кипящей водяной бане в течение 45 минут.

После охлаждения проверяют значение pH и в случае сдвига доводят его опять до 7,8—8, прибавляя 1/15 М раствор одно- или двузамещенной фосфорнокислой соли.

После этого в колбы со смесью вносят ферментный препарат (трипсин, панкреатин, Penicillium, Aspergillus) из расчета 30 мг на 1 г исследуемого вещества, прибав-

---

[1] Все указанные препараты могут быть использованы в качестве протеолитических ферментов. В качестве фосфатазных ферментов можно использовать только препарат Aspergillus и из мицелия Penicillium (препарат Aspergillus рекомендован Научно-исследовательским институтом витаминологии Министерства здравоохранения СССР).

[2] В каждой новой партии фементного препарата следует определить содержание рибофлавина и найденную величину вычесть из общего количества, полученного при анализе исследуемого вещества.

ляют в каждую по 0,5 мл толуола и колбы помещают в термостат при 37° на 12—16 часов.

По истечении указанного времени колбы со смесью вынимают из термостата, pH доводят 0,1 N H_2SO_4 до 4,5 при использовании ферментного препарата Penicillium или до 3,5—4 при использовании препарата Aspergillus, вносят растертый ферментный препарат и вновь помещают в термостат при 37° на 12—16 часов. После инкубации колбы вынимают, охлаждают, объем доводят до общего разведения 1 : 20 или 1 : 30 и вытяжку фильтруют через складчатый фильтр.

Прозрачную жидкость берут на окисление посторонних флуоресцирующих веществ. Для этого из фильтрата отбирают три пробы по 8 мл в стаканчики с притертыми пробками и в каждую из них прибавляют по каплям 4% раствор $KMnO_4$ до тех пор, пока не перестанет исчезать окраска, полученная после размешивания прибавленного перманганата. Вытяжку оставляют на 10 минут и после этого в каждую пробу вносят по каплям для удаления избытка $KMnO_4$ раствор перекиси водорода до исчезновения окраски, хорошо перемешивают и добавляют по 0,2 мл рабочего раствора $SnCl_2$ и по 0,1 мл раствора гидросульфита натрия. Стаканы с вытяжкой закрывают пробками и энергично встряхивают в течение 15—20 минут. После этого объем вытяжки в каждом стаканчике доводят водой до 10 мл и переливают в кюветы флюорометра. Одновременно в другую кювету флюорометра наливают рабочий стандартный раствор и производят измерение интенсивности флуоресценции стандартного и испытуемого раствора по шкале гальванометра.

Затем во все кюветы прибавляют около 0,1 г $NaHCO_3$ и гидросульфита натрия для тушения флуоресценции рибофлавина как в стандартном, так и в испытуемом растворе, где остается флуоресценция только посторонних флуоресцирующих веществ.

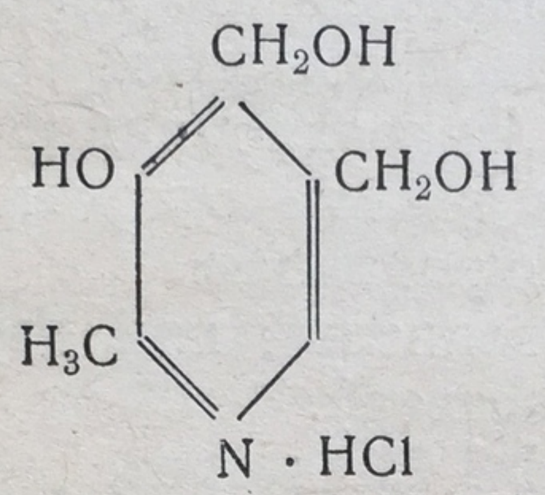
Вычисление результатов анализа

Расчет содержания рибофлавина производят по формуле:

$$x = \frac{(c - c_1) \cdot m \cdot V \cdot V_1}{(n - n_1) \cdot g \cdot V_2}, \qquad (33)$$

где x — количество рибофлавина на 1 г исследуемого вещества в гаммах; c — показания шкалы флюорометра для испытуемого раствора; c_1 — показания шкалы флюорометра для испытуемого раствора после гашения флуоресценции; m — содержание рибофлавина в 1 мл стандартного раствора в гаммах; n — показания шкалы флюорометра для стандартного раствора; n_1 — показания шкалы флюорометра для стандартного раствора после гашения флуоресценции; V — объем раствора, в котором разведена навеска; V_1 — объем раствора после окисления (10 мл); V_2 — объем раствора, взятого на окисление; g — навеска в граммах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА B_6 (ГИДРОХЛОРИДПИРИДОКСИНА) В ЧИСТЫХ ПРЕПАРАТАХ



Структурная формула пиридоксина (гидрохлорида)

Принцип метода

Методом объемного анализа определяется количество хлора, входящего в молекулу витамина B_6 (гидрохлоридпиридоксина). Процентное содержание витамина вычисляют из того расчета, что 1 мл 0,1 N раствора NaOH, пошедшего на титрование, соответствует 0,0205 г гидрохлоридпиридоксина.

Применимость метода

Метод применяют при анализе кристаллических препаратов витамина в порошке и в его растворах в ампулах.

Аппаратура

1. Весы аналитические.
2. Весы технохимические.
3. Разновесы.

Посуда

1. Бюксы крупного размера.
2. Капельница.
3. Колбы конические на 50 и 100 мл.

4. Колбы мерные на 50 и 100 мл.
5. Макробюретка на 25—50 мл.
6. Микробюретка на 2—5 мл.
7. Пипетки на 1—10 мл.
8. Стаканы химические.

Реактивы и приготовление растворов

1. Бромтимоловый синий, 0,1% раствор. 0,1 г индикатора растворяют в 20 мл теплого этилового спирта в мерной колбе емкостью 100 мл и после охлаждения раствор доводят водой до метки.

2. Витамин B_6 (гидрохлоридпиридоксин) кристаллический (хранится в темном сухом месте).

3. Вода дистиллированная.

4. Калий хромовокислый или двухромовокислый насыщенный (40% раствор).

5. Натр едкий, 0,1 N раствор.

6. Серебро азотнокислое, 0,1 N раствор.

7. Спирт этиловый.

АНАЛИЗ КРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ПРЕПАРАТА ГИДРОХЛОРИДПИРИДОКСИНА

Ход анализа

Точную навеску препарата около 0,2 г растворяют в дистиллированной воде, переводят в мерную колбу емкостью 100 мл и объем раствора доводят до метки. Из мерной колбы отбирают 20 мл раствора в коническую колбу на 50—100 мл, прибавляют 2—3 капли индикатора бромтимолового синего (при этом содержимое колбы приобретает желтый цвет) и титруют из микробюретки 0,1 N раствором едкого натра до первого появления голубой окраски.

Для контроля оттитрованный щелочью раствор снова титруют 0,1N раствором азотнокислого серебра в присутствии 2—3 капель насыщенного на холоду раствора хромовокислого калия до первого изменения белого цвета образовавшегося осадка в буроватый. Результаты того и другого титрования или должны совпадать, или раствора азотнокислого серебра может пойти на 0,05—0,08 мл больше. В противном случае анализ необходимо повторить, проверив титры $NaOH$ и $AgNO_3$.

Вычисление результатов анализа

Расчет содержания пиридоксина производят по формуле:

$$x = \frac{0{,}0205 \cdot V \cdot k \cdot V_1 \cdot 100}{a \cdot V_2}, \qquad (34)$$

где x — содержание пиридоксина в процентах; V — количество 0,1 N раствора NaOH, пошедшего на титрование, в миллилитрах; k — поправка для 0,1 N раствора NaOH; 0,0205 — количество пиридоксиногидрохлорида в граммах, соответствующее 1 мл 0,1 N раствора NaOH; V_1 — объем разведения навески в миллилитрах; a — навеска в граммах; V_2 — количество испытуемого раствора, взятого на титрование, в миллилитрах.

АНАЛИЗ РАСТВОРОВ ГИДРОХЛОРИДПИРИДОКСИНА В АМПУЛАХ

Подготовка материала к анализу

Из партии ампул отбирают среднюю пробу в количестве не менее пяти ампул и их содержимое смешивают в стакане или бюксе.

Ход анализа

Из смешанного содержимого ампул отбирают пипеткой по 2 мл в две конические колбы на 100 мл, куда добавляют по 30 мл дистиллированной воды, 2—3 капли бромтимолового синего и титруют из микробюретки 0,1 N раствором едкого натра и азотнокислого серебра так, как это указано в описании метода анализа кристаллического препарата.

Вычисление результатов анализа

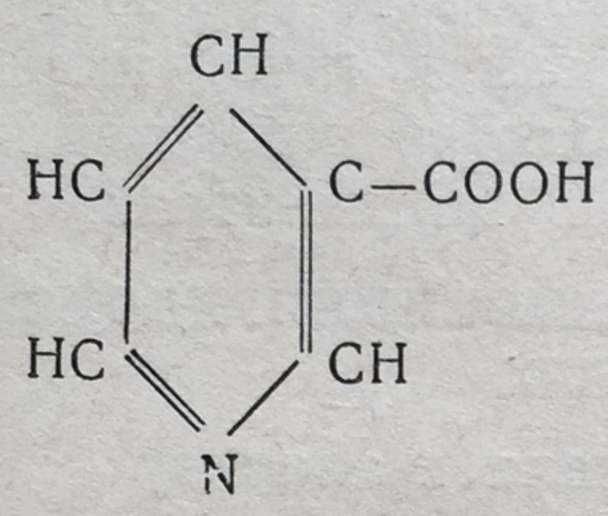
Расчет содержания пиридоксина производят по формуле:

$$x = \frac{0{,}0205 \cdot V \cdot k \cdot 100}{V_2}, \qquad (35)$$

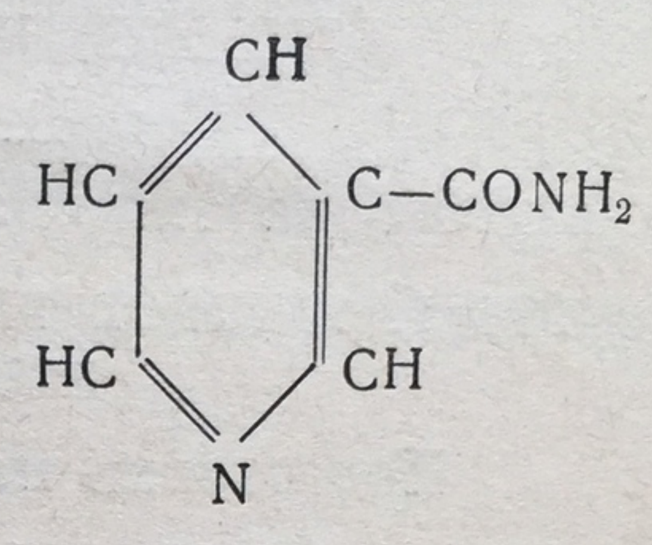
где x — содержание пиридоксина в процентах; остальные обозначения те же, что и в формуле (34).

Результаты параллельных определений из двух отдельных навесок не должны отличаться между собой более чем на 4%.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА PP В ПРЕПАРАТАХ[1]



Структурная формула никотиновой кислоты



Структурная формула амида никотиновой кислоты

ОБЪЕМНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ, ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ

Принцип метода

Никотиновая кислота образует с окисными солями меди нерастворимые комплексы. Реакция проходит в стехиометрических отношениях.

Учитывая йодометрически количество меди, введенной при анализе в раствор исследуемого препарата и оставшейся в свободном состоянии, можно рассчитать количество ее, пошедшее на образование медного комплекса, и таким образом определить содержание никотиновой кислоты.

Применимость метода

Метод применим для анализа препаратов, содержащих только витамин PP в виде никотиновой кислоты.

---

[1] По ГОСТ 7047-55.

Аппаратура

1. Весы аналитические.
2. Весы технохимические.
3. Разновесы.

Посуда

1. Бюксы разных размеров.
2. Микробюретки на 2—5 мл.
3. Бюретки на 25 и 50 мл.
4. Колбы мерные на 50, 100 и 500 мл.
5. Колбы конические на 300—500 мл.
6. Пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл.
7. Воронки разных размеров.
8. Цилиндры на 50, 100 и 250 мл.

Реактивы

1. Натр едкий х. ч. 0,5 и 0,1 N растворы.
2. Медь сернокислая, перекристаллизованная, 10% раствор.
3. Соляная кислота удельного веса 1,19, разведенная водой 1 : 2.
4. Бромтимоловый синий, 1% раствор.
5. Калий йодистый х. ч.
6. Гипосульфит натрия, 0,1 N раствор.
7. Крахмал растворимый, 0,5% раствор.

Ход анализа

При анализе кристаллического препарата берут точную навеску около 0,5 г и растворяют в 25 мл свежепрокипяченной горячей дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл.

При анализе драже или таблеток взвешивают 30—50 штук и определяют вес одной штуки. Из тщательно растертой в ступке пробы берут точную навеску с таким расчетом, чтобы в ней содержалось около 0,5 г витамина PP; навеску также растворяют в 25 мл свежепрокипяченной горячей дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл.

После охлаждения раствор в колбе нейтрализуют 0,5 N и затем 0,1 N раствором NaOH (индикатор — бром-

тимоловый синий), прибавляют 10 мл 10% раствора $CuSO_4$, доводят до метки, перемешивают и через 10—15 минут фильтруют. Затем отбирают в коническую колбу с притертой пробкой 50 мл фильтрата, прибавляют 10 мл разведенной HCl, 2 г KJ и перемешивают. Закрывают колбу пробкой и оставляют в темноте на 10 минут. Выделившийся йод титруют 0,1N раствором гипосульфита натрия (индикатор — крахмал).

В другую коническую колбу с притертой пробкой (контроль) отбирают 5 мл 10% раствора $CuSO_4$, прибавляют 10 мл разведенной HCl, 2 г KJ и через 10 минут выделившийся йод титруют 0,1 N раствором гипосульфита в присутствии крахмала.

Вычисление результатов анализа

Содержание никотиновой кислоты в кристаллическом препарате вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(V - V_1) \cdot 0{,}02462 \cdot 100 \cdot 100}{g \cdot 50}, \qquad (36)$$

где x — содержание никотиновой кислоты в кристаллическом препарате в процентах; V — объем точного 0,1 N раствора гипосульфита, пошедшего на титрование контрольной пробы; V_1 — объем точного 0,1 N раствора гипосульфита, пошедшего на титрование испытуемой пробы; 0,02462 — количество никотиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,1N раствора гипосульфита, в граммах; g — навеска в граммах; 100 — конечный объем, в котором растворена навеска, в миллилитрах; 100 — коэффициент пересчета в проценты; 50 — количество раствора, взятого для титрования, в миллилитрах.

Содержание никотиновой кислоты в одной штуке драже или таблеток вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(V - V_1) \cdot 24{,}62 \cdot P \cdot 100}{g \cdot 50}, \qquad (37)$$

где x — количество никотиновой кислоты в одной штуке драже или таблеток в миллиграммах; P — средний вес одной штуки драже или таблеток в граммах; 100 — конечный объем, в котором растворена навеска, в миллилитрах; 50 — количество раствора, взятого на титрование, в миллилитрах; 24,62 — количество никотиновой

кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 N раствора гипосульфита, в миллиграммах; остальные обозначения те же, что и в формуле (36).

РОДАН-БРОМИДНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИКОТИНОВОЙ КИСЛОТЫ И НИКОТИНАМИДА В КРИСТАЛЛИЧЕСКОМ ПРЕПАРАТЕ, ДРАЖЕ И ТАБЛЕТКАХ

Принцип метода

Никотиновая кислота при взаимодействии с бромистым роданом или цианом образует соединение, которое в присутствии ароматических аминов (анилин, метол) в нейтральной или слабо щелочной среде дает производное, окрашенное в желтый цвет. Интенсивность окраски, зависящая от количества входящей в реакцию никотиновой кислоты, измеряется колориметрически.

Применимость метода

Метод применим для анализа препаратов с витамином PP в виде никотиновой кислоты или в виде никотинамида, а также для анализов поливитаминных препаратов, содержащих рибофлавин.

Аппаратура

1. Колориметр типа Дюбоска или электрофотоколориметр.
2. Водяная баня.

Посуда

Та же, что и при определении никотиновой кислоты объемным методом.

Реактивы

1. Стандартный раствор никотиновой кислоты: 20 мг чистой никотиновой кислоты растворяют в 100 мл дистиллированной воды. 1 мл раствора содержит 0,2 мг никотиновой кислоты (дальнейшая обработка раствора проводится параллельно с испытуемым раствором).
2. Стандартный раствор никотинамида: содержит 0,2 мг в 1 мл (приготовляется, как предыдущий).

3. Стандартный раствор рибофлавина: содержит 0,2 мг в 1 мл.

4. Родан-бромидный раствор: 4 мл брома вносят в 100 мл дистиллированной воды, энергично встряхивают и отстоявшийся раствор декантируют. К охлажденной на льду бромной воде (взятой в количестве, требуемом для анализа) прибавляют по каплям 10% раствор роданистого аммония или калия до светло-желтого окрашивания и затем 1% раствор до полного обесцвечивания. К обесцвеченной бромной воде добавляют постепенно, небольшими порциями, по 20—50 мг углекислого кальция до прекращения выделения пузырьков и образования мути. Раствор фильтруют в склянку темного стекла с притертой пробкой и сохраняют на холоду. Годен в день приготовления.

5. Аммоний роданистый или калий роданистый, 10% раствор.

6. Бром х. ч. удельного веса 3,2 (хранить с предосторожностью!).

7. Анилин, спиртовой раствор: один объем свежеперегнанного над цинковой пылью анилина растворяют в шести объемах 96% этилового спирта. Раствор должен быть бесцветным (хранить в склянке темного стекла с притертой пробкой в темноте и на холоду).

8. Спирт этиловый 96%, ректификат.

Ход анализа

Перед анализом необходимо определить, содержит ли испытуемый препарат никотиновую кислоту или никотинамид. Для этого небольшое количество испытуемого растертого препарата помещают в пробирку, добавляют 1—2 мл воды, $^1/_2$ объема 40% раствора едкого натра и содержимое пробирки нагревают на кипящей водяной бане около 2 минут. В присутствии никотинамида появляется запах аммиака.

При анализе кристаллического препарата берут точную навеску около 25 мг, растворяют в 25 мл горячей дистиллированной воды в мерной колбе на 250 мл; после охлаждения доводят до метки и перемешивают.

При анализе драже и таблеток взвешивают 30—50 штук и определяют вес одной штуки. Из растертой в ступке пробы берут точную навеску с таким расчетом,

чтобы в ней содержалось около 5 мг витамина PP. Навеску растворяют в небольшом количестве горячей дистиллированной воды в мерной колбе на 50 мл. После охлаждения раствор доводят водой до метки, перемешивают и фильтруют. После этого приступают к определению никотиновой кислоты.

5 мл стандартного раствора и 5 мл фильтрата испытуемого раствора помещают соответственно в конические колбы с притертыми пробками емкостью 20—50 мл, подогревают на водяной бане до 60—70° и прибавляют в каждую из них по 2 мл родан-бромидного раствора, продолжая подогревать в течение 5—10 минут. После охлаждения в каждую пробирку прибавляют по 7 мл раствора анилина, хорошо перемешивают и оставляют стоять в темноте в течение 30 минут. По истечении указанного времени содержимое колб или пробирок осторожно сливают или фильтруют. Полученные окрашенные растворы колориметрируют.

Примечание. В случае анализа препарата, содержащего вместе с никотиновой кислотой еще и рибофлавин, необходимо внести в анализ следующие дополнительные изменения.

В фильтрате после растворения навески определяют содержание рибофлавина и установленную концентрацию создают в рабочем стандартном растворе никотиновой кислоты. Для этого при изготовлении рабочего стандартного раствора никотиновой кислоты в него вносят определенные количества раствора рибофлавина.

Дальнейший анализ ведется без изменений.

Вычисление результатов анализа

Содержание никотиновой кислоты вычисляют по следующим формулам.

а) При пользовании колориметром типа Дюбоска — для кристаллического препарата:

$$x = \frac{c \cdot h_1 \cdot V \cdot 100}{h_2 \cdot g \cdot 1000 \cdot 1000}, \qquad (38)$$

для драже:

$$x_1 = \frac{c \cdot h_1 \cdot V \cdot P}{h_2 \cdot g \cdot 1000}, \qquad (39)$$

где x — количество никотиновой кислоты в миллиграмм-процентах; x_1 — количество никотиновой кислоты в мил-

лиграммах в одной штуке драже; c — количество витамина PP в 1 мл стандартного раствора в мг; h_1 — высота столба стандартного раствора в миллиметрах; h_2 — высота столба испытуемого раствора в миллиметрах; g — навеска в граммах; V — объем раствора, в котором разведена навеска, в миллилитрах; 1000 — коэффициент пересчета в миллиграммы; 1000 — коэффициент пересчета в граммы; 100 — коэффициент пересчета в проценты; P — средний вес одной штуки драже.

б) При пользовании электрофотоколориметром — для кристаллического препарата:

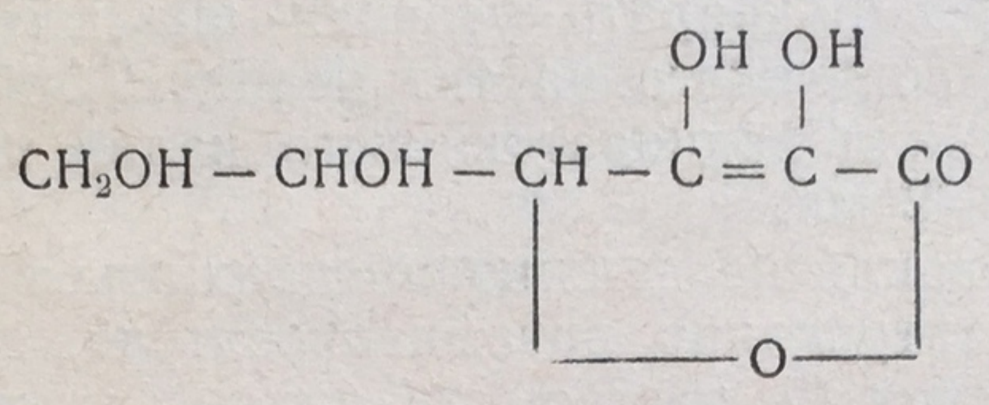
$$x = \frac{n \cdot V \cdot 100}{g \cdot 1000 \cdot 1000}; \qquad (40)$$

для драже:

$$x_1 = \frac{n \cdot V \cdot P}{g \cdot 1000}, \qquad (41)$$

где n — содержание никотиновой кислоты или никотинамида, найденное по калибровочной кривой; остальные обозначения те же, что и в формулах (36) и (37).

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С (АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ)



Структурная формула аскорбиновой кислоты

Изложенные методы применяются для определения аскорбиновой кислоты в витаминных препаратах, растительных объектах, пищевых продуктах и готовой пище.

Методы определения аскорбиновой кислоты подразделяются (согласно ГОСТ 7047-55) на арбитражные и контрольные.

Они основаны на реакции аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом или с йодом, подвергающимся при этом восстановлению.

Ход реакции между аскорбиновой кислотой и 2,6-дихлорфенолиндофенолом следующий:

$$\underset{\text{Аскорбиновая кислота}}{C_6H_8O_6} + \underset{\text{Краска—2,6-дихлорфенолиндофенол}}{O : C_6H_2Cl_2 : N — C_6H_4ONa} =$$

(1 моль = 176) (1 моль = 290)

$$= \underset{\text{Дегидроаскорбиновая кислота}}{C_6H_6O_6} + \underset{\text{Лейкоформа 2,6-дихлорфенолиндофенола}}{HOC_6H_2Cl_2 \cdot NH \cdot C_6H_4ONa}$$

Ход реакции между аскорбиновой кислотой и йодноватокислым калием:

а) $5KJ + KJO_3 + 6HCl = 6KCl + 3H_2O + 3J_2$,

б) $C_6H_8O_6 + J_2 = C_6H_6O_6 + 2HJ$.

При определении аскорбиновой кислоты необходимо учитывать следующее:

1. При каждом анализе арбитражным методом или его модификацией, а также контрольными методами производят не менее двух параллельных определений и не менее чем с двумя различными навесками.

2. Для титрования пользуются микробюретками.

3. Повторные титрационные числа при каждом определении не должны расходиться между собой более чем на 0,03 мл.

4. Следует подбирать условия анализа так, чтобы количество пошедшего на титрование 2,6-дихлорфенолиндофенола или йодноватокислого калия находилось в пределах 1—2 мл.

5. Титрование не должно продолжаться более 2 минут. При титровании витаминоносителя, содержащего мало витамина С, раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола или йодноватокислого калия приливают из микробюретки по каплям; при титровании витаминоносителя, содержащего много витамина, можно вначале прибавлять сразу по несколько капель этих реактивов.

6. Титрование следует производить в определенном объеме жидкости и в посуде с определенной нижней поверхностью, так как в этих условиях глаз анализирующего привыкает точнее улавливать конец реакции (появление розовой или синей окраски).

7. Результаты параллельных определений при анализе не должны расходиться между собой более чем на 5%.

8. При анализе синтетической аскорбиновой кислоты и ее ампульных препаратов пользуются макробюретками. Результаты титрования не должны расходиться между собой более чем на 0,03 мл; расхождения в результатах анализа между навесками не должны превышать 0,5%.

9. При ведении анализов и для приготовления растворов пользуются дистиллированной водой, перегнанной в аппаратуре из стекла; при приготовлении 0,01 N растворов щавелевокислого натрия и аммония пользуются дважды перегнанной водой.

За исключением специально оговоренных случаев, следует применять только химически чистые реактивы.

Вся мерная посуда, а также микро-макробюретки должны быть калиброваны.

ТОЧНЫЙ (АРБИТРАЖНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ БЕЗ ПРИМЕНЕНИЯ СЕРОВОДОРОДА[1]

Принцип метода

Экстрагирование витамина С из анализируемого материала уксусной кислотой; освобождение экстракта от посторонних редуцирующих веществ и пигментов путем их осаждения уксуснокислым свинцом и последующее титрование экстракта при кислой реакции (pH приблизительно 3—4) краской 2,6-дихлорфенолиндофенолом, восстанавливающейся в лейкосоединение за счет эквивалентного окисления витамина С.

Применимость метода

Метод применяется в тех случаях, когда требуется наибольшая точность определения, в том числе и в спорных случаях.

Аппаратура

1. Весы аналитические.
2. Весы технохимические.
3. Весы аптечные.
4. Весы тарелочные.
5. Весы центрифужные.
6. Разновесы.
7. Центрифуга (емкость стаканов 60—80 мл) на 2500 оборотов в минуту.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

1. Бюксы.
2. Вата гигроскопическая.
3. Воронки малого (3—5 см), среднего и большого диаметра.
4. Воронки делительные на 50—100 мл.
5. Колбы конические емкостью 50—100 мл.

---

[1] В ГОСТ 7047-54 и 7047-55 обозначен как «Модификация арбитражного метода».

6. Колбы для перегонки воды.
7. Ложки фарфоровые и алюминиевые.
8. Марля.
9. Мерные колбы емкостью 25—50—100—200 мл и 1 л.
10. Мерные цилиндры на 100—250 и 500 мл.
11. Микробюретки на 1—2 и 5 мл.
12. Набор химических стаканов.
13. Набор пипеток на 0,5—10 мл; пипетки на 1 мл с делениями через 0,1 мл.
14. Нож металлический никелированный.
15. Пикнометры.
16. Пробирки.
17. Сито волосяное.
18. Стаканчики центрифужные на 50—100 мл.
19. Стеклянные палочки или лопаточки.
20. Ступки фарфоровые диаметром 10—20 см с пестиком.
21. Фильтровальная бумага или фильтры.
22. Холодильники.
23. Чашки фарфоровые малого диаметра.
24. Шпатель роговой или фарфоровый.
25. Штативы металлические с набором лапок.
26. Штативы деревянные.
27. Штопор.
28. Эксикаторы небольшие.

Реактивы

1. Аскорбиновая кислота синтетическая кристаллическая (медицинская).
2. Аскорбиновая кислота, 10 мг% раствор.
3. Аммоний щавелевокислый, 0,01 N раствор.
4. Аммоний щавелевокислый, насыщенный раствор (7 г на 100 мл воды).
5. Бидистиллированная вода.
6. Буферная смесь (монофосфат калия и дифосфат натрия).
7. Дистиллированная вода.
8. Калий йодистый.
9. Калий йодистый, 1% раствор.
10. Калий йодноватокислый, 0,1, 0,01, и 0,001 N растворы.

11. Калий марганцовокислый.

12. Калий марганцовокислый, 0,1 и 0,01 N растворы.

13. Калий монофосфат.

14. Кальций углекислый.

15. Кислота серная удельного веса 1,84.

16. Кислота серная удельного веса 1,84 в разведении 1 : 2 (по объему).

17. Кислота серная удельного веса 1,84 в разведении 1 : 4 (по объему).

18. Кислота серная, 0,02 N раствор (берут 0,56 мл серной кислоты удельного веса 1,84 и доводят дистиллированной водой до объема 1 л).

19. Кислота серная, 2% раствор (берут 1,09 мл серной кислоты удельного веса 1,84 и доводят дистиллированной водой до 1 л).

20. Кислота соляная удельного веса 1,19; раствор 1 : 1 (по объему).

21. Кислота соляная, 2% раствор (берут 45,1 мл соляной кислоты удельного веса 1,19 и доводят дистиллированной водой до объема 1 л).

22. Кислота уксусная, 80% раствор.

23. Кислота уксусная, 5% раствор (берут 58 мл 80% уксусной кислоты и доводят дистиллированной водой до объема 1 л).

24. Крахмал растворимый, 1% и 0,5% растворы.

25. Натрий дифосфат.

26. Натрий серноватистокислый (гипосульфит), 0,1 и 0,01 N растворы.

27. Натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001 N раствор (реактив Тильманса).

28. Натрий щавелевокислый.

29. Натрий щавелевокислый, 0,01 N раствор.

30. Натрий щавелевокислый, насыщенный раствор (7 г на 100 мл воды).

31. Свинец уксуснокислый, 5% раствор (приготовляют на 5% уксусной кислоте). Недостаточно чистая соль свинца должна быть трижды перекристаллизована.

32. Соль Мора — двойная сернокислая соль закиси железа и аммония [$FeSo_4 (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$], 0,01 N раствор.

33. Спирт-ректификат.

34. Стеклянный порошок, приготовленный из чистого, не зеленого лабораторного стекла.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

Приготовление бидистиллированной воды. Бидистиллированная вода получается вторичной перегонкой дистиллированной воды из обыкновенной стеклянной колбы с холодильником. В колбу на 2 л воды прибавляют марганцовокислого калия 0,1 г и несколько капель концентрированной химически чистой серной кислоты удельного веса 1,84.

Приготовление раствора крахмала. Для приготовления 0,5% раствора крахмала в ступке тщательно растирают 0,5 г растворимого крахмала, отвешенного с точностью до 0,01 г, с 5 мл воды до получения однородной кашицы. Полученную смесь медленно вливают при постоянном размешивании в 100 мл кипящей воды. Кипятят 2—3 минуты до получения прозрачной или слабо опалесцирующей жидкости, после чего фильтруют. Раствор может сохраняться на холоду не более 2—3 дней.

Приготовление буферной смеси. Отвешивают 11,876 г $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ и 9,078 г KH_2PO_4 и каждую навеску растворяют отдельно в 1 л воды. Затем смешивают 7 частей первого и 3 части второго раствора. pH полученной смеси должен быть приблизительно равен 7.

Приготовление рабочего раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. 0,2 г 2,6-дихлорфенолиндофенола переносят в мерную колбу на 1 л, прибавляют 600 мл дистиллированной воды, энергично взбалтывают в течение 10 минут и оставляют растворяться на ночь. Затем раствор фильтруют и доводят дистиллированной водой до метки. Срок годности раствора не превышает 7 дней. Хранить раствор необходимо в темном месте.

Приготовление рабочего раствора KJO_3. Для приготовления 0,1 N раствора йодноватокислого калия отвешивают 3,567 г химически чистого вещества на 1 л дистиллированной воды, из которого по мере надобности путем разведения 1 : 100 получают 0,001 N раствор. При отсутствии чистого йодноватокислого калия титр его определяют по 0,1 N раствору серноватистокислого натрия (24,82 г на 1 л дистиллированной воды). Титр раствора серноватистокислого натрия устанавливают по 0,1 N раствору марганцовокислого калия (3,158 г на 1 л дистиллированной воды), который в свою очередь

проверяют по точной навеске щавелевокислого натрия. Растворы йодата калия хранят в склянках из желтого стекла в темноте.

Приготовление точного 10 мг % раствора аскорбиновой кислоты. На аналитических весах отвешивают 0,1 г аскорбиновой кислоты и растворяют в дистиллированной воде в мерной колбе на 100 мл. Раствор хорошо перемешивают путем переворачивания колбы, из него берут пипеткой 10 мл, вносят в мерную колбу на 100 мл, доводят до метки дистиллированной водой и вновь хорошо перемешивают. Полученный 10 мг% раствор должен быть тотчас использован для соответствующего определения.

Получение стеклянного порошка. Рекомендуется производить измельчение стекла в специальном деревянном ящике, на дне которого устанавливается ступка. Верхняя часть ящика должна быть из искусственного стекла для наблюдения за измельчением. Одна из стенок делается выдвижной для установки ступки на дно ящика. В боковых стенках ящика вырезаются круглые отверстия для рук; по краям этих отверстий снаружи прибиваются рукава из клеенки с резинкой для того, чтобы во время работы стеклянная пыль не вылетала из ящика и не загрязняла воздух.

2 **Установка титра рабочего раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.** Приготовленный рабочий раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола не имеет точно миллинормальный титр, так как при хранении он меняется. Поэтому титр необходимо проверять ежедневно. Проверка производится по одному из следующих способов.

По раствору соли Мора. В коническую колбу наливают 10 мл рабочего раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и 5 мл насыщенного раствора щавелевокислого аммония, а в микробюретку — раствор соли Мора, титр которого известен, и титруют до тех пор, пока синий цвет краски не сменится сначала на зеленоватый, а затем на соломенно-желтый (нерезкая перемена окраски, возникновение оттенка бурого цвета указывают на порчу реактива).

Для получения приблизительно 0,01 N раствора соли Мора навеску в 3,92 г соли растворяют в 1 л 0,02 N серной кислоты. Раствор соли Мора следует хранить в склянке из темного стекла и проверять через каждые

3—4 недели. Титр раствора соли Мора устанавливается по титрованному 0,01 N раствору перманганата (0,316 г на 1 л воды), причем на 10 мл раствора соли Мора приливают 1,5 мл серной кислоты, разведенной в отношении 1 : 2. Титрование считается законченным при появлении стойкого слабо розового окрашивания. Титр раствора марганцовокислого калия устанавливается по химически чистому щавелевокислому натрию или аммонию не менее чем на двух навесках и также проверяется через 3—4 недели.

Для приготовления точного 0,01 N раствора щавелевокислого натрия или аммония берут соответственно навеску 0,067 или 0,062 г на 100 мл бидистиллята. Эти растворы всегда употребляются свежими. Перед взятием навесок необходимо нужное количество щавелевокислого натрия или аммония оставить на несколько часов в открытом бюксе над серной кислотой в эксикаторе, так как эти соли гигроскопичны.

К 10 мл раствора щавелевокислого натрия (или аммония) прибавляют 2,5 мл серной кислоты, разведенной 1 : 2. Титрование марганцовокислым калием ведут при нагревании на водяной бане при температуре, близкой к кипению (не допускать кипения!). Конец реакции определяется появлением слабо розовой окраски.

Поправка (F) на титр краски вычисляется по формуле:

$$F = \frac{V_1 \cdot V_2}{V_3}, \qquad (42)$$

где V_1 — число миллилитров раствора соли Мора, затраченного на титрование 10 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; V_2 — количество миллилитров раствора перманганата, израсходованного на титрование 10 мл соли Мора; V_3 — количество миллилитров раствора перманганата, пошедшего на титрование 10 мл точно 0,01 N раствора щавелевокислого натрия или аммония.

По гипосульфиту. Установка титра по гипосульфиту основана на способности 2,6-дихлорфенолиндофенола количественно окислять йодиды в йод.

В коническую колбу емкостью на 50 мл вносят 10 мл приблизительно 0,001 N раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола и туда же прибавляют 0,5—1 г йодистого калия и 0,5—1 мл серной кислоты, разведенной в соотношении

1 : 4. Налитую в коническую колбу жидкость слегка взбалтывают и освободившийся при окислении йодистого калия йод титруют из микробюретки 0,01 N раствором гипосульфита; индикатором служит 1% раствор крахмала. Количество аскорбиновой кислоты, соответствующее взятому объему раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, определяют, умножая объем пошедшего при титровании 0,01 N раствора гипосульфита на 0,88.

«Слепой» опыт производится следующим образом. В коническую колбу наливают 10 мл дистиллированной воды, прибавляют туда 0,5—1 г йодистого калия, 0,5—1 мл серной кислоты указанной крепости и титруют 0,01 N раствором гипосульфита. Полученную поправку учитывают при расчете.

По йодату. Несколько кристаллов аскорбиновой кислоты растворяют в 50 мл 2% серной кислоты. Затем в две фарфоровые чашки (или колбочки, поставленные на белую бумагу) отбирают одной и той же пипеткой по 5 мл полученного раствора для титрования из микробюретки в одном случае рабочим, приблизительно 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, в другом — точным 0,001 N раствором йодата. В последнем случае титрование производят в присутствии нескольких кристаллов KJ и 2—3 капель 1% раствора крахмала до появления голубого окрашивания.

При титровании 2,6-дихлорфенолиндофенолом конец реакции определяется появлением стойкого розового окрашивания.

Расчет титра раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола производят по нижеуказанной формуле, исходя из того, что 1 мл точно 0,001 N раствора йода, а значит и йодата, эквивалентен 0,088 мг аскорбиновой кислоты.

$$x = \frac{0{,}088 \cdot V_1}{V_2} \text{ мг}, \qquad (43)$$

где x — титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола; V_1 — количество 0,001 N раствора KJO_3, пошедшего на титрование, в миллилитрах; V_2 — количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, пошедшего на титрование, в миллилитрах, 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, эквивалентное 1 мл 0,001 N раствора J_2 и KJO_3, в миллиграммах.

Таким образом определяют, какому количеству аскорбиновой кислоты (в миллиграммах) эквивалентен 1 мл раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола.

По аскорбиновой кислоте. В микробюретку на 2 мл наливают рабочий раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола.

В 2—3 конические колбы емкостью по 50 мл каждая отмеривают пипеткой по 1 мл точного 10 мг% раствора аскорбиновой кислоты, по 1 мл 2% раствора соляной кислоты и по 3 мл дистиллированной воды. Смесь титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Титрование раствора аскорбиновой кислоты производится при его постоянном легком взбалтывании до получения стойкого розового окрашивания, удерживающегося в течение $^1/_2$—1 минуты.

По окончании титрования записывают количество краски, пошедшее на титрование 1 мл раствора аскорбиновой кислоты, и прибавляют для контроля последовательно еще 2 капли раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола. Если окончание титрования было определено правильно, то эти две контрольные капли дадут уже интенсивное розовое окрашивание. После этого вычисляют, какому количеству аскорбиновой кислоты соответствует 1 мл краски.

К концу титрования жидкость может приобретать желтоватый оттенок.

Подготовка материала к анализу

Навески для анализа берут, соблюдая следующие требования.

Все жидкие продукты, а также продукты, имеющие консистенцию паст и пюре, должны быть тщательно и осторожно перемешаны путем переворачивания тары, но не взболтаны (!) во избежание аэрации.

В сиропах, жидких концентратах после размешивания определяют удельный вес по общим правилам (для перечисления содержания витамина С на единицу объема).

Препараты в форме порошков перед взятием навесок тщательно перемешивают.

Таблетки и драже размельчают в фарфоровой ступке и тщательно размешивают. Для размельчения берут

возможно больше материала — 30—50 штук драже или таблеток. Перед измельчением штучный материал взвешивают на технохимических весах и определяют средний вес одной штуки.

Витаминизированные кондитерские изделия (конфеты, пряники и печенье) берут для анализа в количестве не менее 200 г, определяют средний вес одной штуки, а затем анализируемый материал подвергают размельчению и растиранию в ступке.

Твердые растительные объекты (типа сушеного картофеля, плиточного чая и т. п.), а также кулинарные изделия (типа кексов) в количестве не менее 50 г измельчают в мельнице или мясорубке и затем тщательно перемешивают.

Содержимое консервов после вскрытия банки немедленно полностью переносят в ступку, измельчают и перемешивают. В случае неоднородного состава консервов прибегают к измельчению с помощью мясорубки.

При анализе плодов и овощей общий вес пробы должен быть не менее 200 г. Из них вырезают сегменты, которые немедленно употребляют на анализ. Ягоды и мелкие сочные плоды анализируют в целом виде. Пробу зелени берут в количестве не менее 100 г.

При анализе первых блюд исследуют отдельно жидкую и твердую часть блюда. Суп-пюре анализируют, как целое. Вторые блюда анализируют, как твердую часть первого блюда.

Из измельченного и перемешанного материала берут две-три навески на хороших технохимических весах, за исключением навесок синтетической аскорбиновой кислоты, которую отвешивают на аналитических весах.

Взвешивание готовых блюд производят с точностью до 1 г, остальных объектов — с точностью до 0,01 г, за исключением синтетической аскорбиновой кислоты, которую отвешивают с точностью до 0,0002 г.

Жидкие продукты (соки, настои и т. п.) берут для анализа пипеткой; жидкости густой консистенции (густые сиропы, концентраты и пр.), плохо стекающие с пипетки, взвешивают в тарированной посуде на технохимических весах.

Величины навесок различных продуктов берут в зависимости от большего или меньшего содержания в них витамина С:

Наименование объекта	Величина навески
Драже, таблетки, порошок и концентраты шиповника, концентраты из хвои	1— 2 г
Таблетки витамина С с глюкозой	2— 3 „
Сироп из плодов шиповника	5 „
Чай витаминизированный плиточный	2— 5 „
Витаминизированные конфеты и чай (кирпичный)	10—50 „
Настои (хвои, шиповника)	10—20 мл
Соки и экстракты	1—50 „
Плоды шиповника очищенные, пюре из шиповника с сахаром, хвоя	5 г
Плоды шиповника целые, картофель сушеный, картофель сушеный сульфитированный и другие сушеные сульфитированные продукты . .	10 „
Консервы	5—10 „
Свежие растительные продукты (фрукты, плоды, ягоды и зелень)	10—50 „
Блюда готовые:	
Твердая часть первого блюда и второе блюдо	20—50 „
Жидкая часть первого блюда	20—50 мл
Молоко	5 „
Витаминизированный хлеб	60 г

Примечание. Для арбитражного анализа навески очищенных плодов шиповника берут из хорошо измельченной средней пробы (100 г) в количестве 10 г, целых плодов —в количестве 20 г.

Ход анализа жидких продуктов

Взятые для анализа (по объему или весу) навески жидких продуктов разводят раствором 5% уксусной кислоты до определенного объема в мерной колбе на 50—100 мл. Материалы с слабой С-витаминной активностью ниже 20 мг% (жидкая часть первого блюда, некоторые соки и пр.) разводят уксусной кислотой без употребления мерных колб. В этом случае, в зависимости от содержания витамина С, уксусную кислоту берут к весу навески в соотношении 1 : 1 или больше.

10 мл таких «первоначальных растворов» вносят пипеткой в коническую колбу или центрифужный стаканчик емкостью 60—80 мл, прибавляют туда, слегка встряхивая ввиду возможного образования пены, 0,4 г химически чистого углекислого кальция. (pH при этом доходит до 5). Затем прибавляют 5 мл 5% раствора уксуснокислого свинца, взбалтывают и тотчас же центрифу-

гируют в течение 1—2 минут или фильтруют через заранее приготовленные складчатые фильтры, так как в этих условиях витамин С неустойчив [1]. В случае очень слабых витаминоносителей следует употреблять беззольные фильтры или фильтры, промытые 2% раствором соляной кислоты и затем высушенные.

Центрифугат или фильтрат в объеме 1—10 мл, в зависимости от С-витаминной активности, вносят сейчас же пипеткой в две-три конические колбы, куда заранее было налито по 1 мл 2% раствора соляной кислоты. Затем прибавляют столько дистиллированной воды, чтобы общий объем жидкости при титровании был равен 15 мл [2] (pH около 3—4), и, слегка взбалтывая содержимое колбочки, титруют из микробюретки 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления розового окрашивания, удерживающегося в течение 1/2—1 минуты.

Когда конец титрования установлен и показания бюретки записаны, необходимо прилить последовательно еще две контрольные капли раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, и только в том случае, если они дадут интенсивное розовое окрашивание, можно считать, что конец титрования определен правильно.

Анализ повторяют снова с таким же объемом «первоначального раствора», проделывая весь указанный выше ход анализа. В случае получения близких титрационных чисел (расхождения в пределах 0,03—0,04 мл допустимы) из них вычисляют среднее.

Примечание. Как уже было указано ранее, титрование не должно продолжаться более 2 минут, а количество раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, затрачиваемого на одно титрование, не должно быть более 2 мл и менее 1 мл. Это требование обусловлено тем, что при меньшем чем 1 мл количестве индикатора, пошедшего на титрование, возможная ошибка анализа составит заметный процент; при большем чем 2 мл количестве индикатора титрование будет продолжаться дольше 1—2 минут, что позволит другим восстанавливающим веществам вступить в реакцию с индикатором.

---

[1] В тех случаях, когда витаминоносители обладают незначительной С-витаминной активностью, вместо 10 мл раствора можно брать 20 мл с пропорциональным увеличением углекислого кальция и уксуснокислого свинца; это позволит впоследствии производить титрование в больших количествах жидкости.

[2] Если титруемая жидкость очень мутна или окрашена, можно прибавлять воду до общего объема 30 мл.

Если при первом, пробном, титровании окажется, что раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола идет много, то «первоначальный раствор», из которого берут по 10 мл для обработки углекислым кальцием и уксуснокислым свинцом, исходя из пробного титрования, нужно развести 5% раствором уксусной кислоты. Это разведение является вторичным по отношению к навеске; оно учитывается при конечном расчете результатов путем введения в числитель формулы вычисления дополнительного множителя, смотря по принятому разведению. В тех же целях вместо разведения можно брать для титрования меньшее количество жидкости.

Ход анализа твердых продуктов

Навески твердых продуктов тщательно растирают до мелкого однородного состояния, применяя в случаях надобности 5—10 г стеклянного порошка, при постепенном добавлении 5% раствора уксусной кислоты в кратном соотношении к навеске (но не менее 3 мл на 1 г навески).

При употреблении в ходе анализа мерной посуды стеклянный порошок не применяют. Уксусную кислоту отмеривают предварительно в нужном объеме пипеткой или мерным цилиндром. После растирания в ступке смесь оставляют в ней настаиваться в течение 10 минут. После настаивания таких продуктов, как драже, таблеток или порошков шиповника, содержимое ступки количественно переносят в мерную колбу емкостью 100 мл. В этом случае отмеренную для настаивания кислоту расходуют не всю: часть ее оставляют для промывания ступки пестика и для доведения жидкости в колбе до метки. Содержимое колбы перед переносом в центрифужные стаканы перемешивают переворачиванием и обрабатывают в дальнейшем перед титрованием так, как указано ниже. Навески хорошо растворяющихся драже и таблеток допустимо переносить непосредственно в мерную колбу для растворения в ней и настаивания; полученные растворы центрифугированию не подлежат.

При исследовании других объектов 5% раствор уксусной кислоты вносят в ступку в кратном количестве по отношению к анализируемой навеске. В том случае, когда штучные кондитерские изделия измельчаются не-

равномерно, их средние пробы переносят непосредственно в ступку, где они растворяются с уксусной кислотой и в ней настаиваются.

По окончании настаивания жидкость из ступки разливают вместе с нерастворившейся частью по центрифужным стаканам и центрифугируют до просветления. При отсутствии центрифуги центрифугирование можно заменить фильтрованием через гигроскопическую вату или марлю, сложенную в несколько слоев. После центрифугирования содержимое центрифужных стаканов сливают в один сосуд, перемешивают и дальше обрабатывают, как «первоначальный экстракт».

При применении фильтрования содержимое ступки после настаивания тщательно перемешивают и отфильтровывают такое количество перемешанной жидкости, которого должно хватить в случае надобности на несколько повторных анализов. Из полученных таким образом «первоначальных экстрактов» берут по 10 мл, обрабатывают их углекислым кальцием и уксуснокислым свинцом по прописи, указанной на стр. 110—111 для растворов, получающихся разведением жидких продуктов.

Затем устанавливают поправку на «слепой» опыт. Для этого в коническую колбу наливают 1 мл 2% раствора соляной кислоты и воды в количестве, необходимом для получения объема, равного объему, применявшемуся при титровании, и прибавляют из микробюретки по каплям 0,001 N раствор 2,6-дихлорфенолиндофенола до первого появления розовой окраски. Количество миллилитров раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, затраченного для титрования, является поправкой на «слепой» опыт (обычно для объема в 15 мл поправка равняется 0,04—0,06 мл). Это количество вычитают из числа миллилитров реактива, израсходованного на титрование анализируемого экстракта.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты в объекте вычисляют по следующей формуле, учитывая, что 1 мл 0,001 N раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола соответствует 0,088 мг аскорбиновой кислоты:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot V_2 \cdot 1{,}5 \cdot 0{,}088 \cdot 100}{V_3 \cdot g}, \qquad (44)$$

где x — количество аскорбиновой кислоты в анализируемом веществе в миллиграмм-процентах; V_1 — количество рабочего раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, израсходованного на титрование, за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; F — поправка на титр раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, V_2 — количество смеси или раствора, полученное после прибавления к навеске экстрагирующей жидкости, в граммах (или миллиграммах); 1,5 — коэффициент[1], полученный в результате деления 15 на 10 (10 — объем «первоначального экстракта» или «первоначального раствора», взятого для анализа, а 15 — сумма числовой величины этого объема и 5 мл раствора уксуснокислого свинца); V_3 — количество анализируемой жидкости, взятое непосредственно для титрования, в миллилитрах; g — навеска анализируемого вещества в граммах.

Если применялось вторичное разведение экстракта, то в числитель вносят соответствующий множитель.

Для пересчета содержания витамина С на объемные величины определяется удельный вес жидких препаратов, причем определение производится не менее чем на двух пробах.

ТОЧНЫЙ (АРБИТРАЖНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ С 2,6-ДИХЛОРФЕНОЛИНДОФЕНОЛОМ С ПРИМЕНЕНИЕМ СЕРОВОДОРОДА[2]

Принцип метода

Принцип метода тот же, что указан на стр. 101, только перед титрованием полученный экстракт витамина С подвергается обработке сероводородом.

---

[1] В ГОСТ 7047-55 число 1,5 заменено буквенным обозначением $\frac{V_4}{V_5}$; V_4 — объем «первоначального раствора» или «первоначального экстракта» (10 мл), взятого для анализа после прибавления к нему 5% раствора уксуснокислого свинца. V_5 — объем (10 мл) «первоначального раствора» или «первоначального экстракта», взятого для анализа перед его обработкой 5% раствором уксуснокислого свинца.

[2] В ГОСТ 7047-55 обозначен как «Арбитражный метод (с применением сероводорода»).

Применимость метода

Применяется обязательно при анализе всякого нового продукта, при анализе интенсивно окрашенных объектов и объектов, в которых есть основание ожидать значительного количества (более 10%) дегидроаскорбиновой кислоты (некоторые свежие растительные продукты, продукты, подвергшиеся термической обработке и хранению), а также значительного количества редуцирующих веществ, не удаляемых из экстракта витамина С без применения сероводорода.

При анализе нового продукта арбитражным методом с H_2S производят параллельно определение каким-либо из других методов. Прежде всего проводят анализ по модификации арбитражного метода без применения сероводорода.

В тех случаях, когда выбранный метод дает сходящиеся результаты с арбитражным методом с применением сероводорода, возможно в дальнейшем пользоваться им, поскольку анализ по арбитражному методу с сероводородом является наиболее трудоемким.

Кроме того, сероводород применяют в ходе анализа: а) для удаления олова, переходящего в анализируемый материал из тары (в баночных консервах); б) для устранения мутности в экстрактах при анализе хлебных витаминизированных изделий.

Аппаратура

Аппарат Киппа. Остальная аппаратура та же, что и при определении аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

Те же, что указаны в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Реактивы

1. Железо сернистое ч. д. а.
2. Кислота соляная техническая, раствор 1 : 1 (по объему).

3. Мрамор в кусках или в виде крошки.

4. Натр едкий, 10% раствор.

5. Свинец уксуснокислый, насыщенный раствор (около 80 г на 100 мл воды).

6. Спирт-ректификат.

7. Углекислый газ в баллонах.

Остальные реактивы те же, что и при определении аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

То же, что указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Подготовка материала к анализу

Та же, что указана в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ход анализа

Ход анализа как для жидких, так и для твердых продуктов сходен с ходом анализа по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода вплоть до фазы титрования. Затем анализ ведут следующим образом.

Тотчас после обработки «первоначального экстракта» или «первоначального раствора» углекислым кальцием и уксуснокислым свинцом и отцентрифугирования или отфильтрования получившегося осадка через экстракт пропускают в течение 5 минут ток сероводорода (скорость прохождения сероводорода не должна быть медленной) [1]. Для более быстрого образования осадка сернистого свинца экстракт тотчас же после начала пропускания сероводорода энергично взбалтывают. Выпавший осадок сернистого свинца отфильтровывают и через фильтрат, налитый в сосуд (например, в центри-

[1] Все манипуляции с сероводородом необходимо производить в вытяжном шкафу через небольшие форточки, сделанные в дверцах шкафа.

фужный стаканчик) с пробкой, в который вставлены две стеклянные трубочки, согнутые под прямым углом, пропускают для удаления сероводорода ток углекислоты из баллона или аппарата Киппа[1].

В аппарате Киппа углекислота получается действием на мрамор технической соляной кислоты, разведенной в отношении 1 : 1; между аппаратом Киппа и обрабатываемым раствором ставят промывалку с раствором марганцовокислого калия. Полноту удаления сероводорода из экстракта контролируют путем сравнения бумажки, смоченной насыщенным раствором уксуснокислого свинца, с бумажкой, смоченной простой водой[2]. Первая бумажка при удалении сероводорода не должна темнеть. Если сероводород не удален полностью, то конец титрования будет растянут.

После удаления сероводорода анализируемую жидкость титруют 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Вычисление результатов анализа

Расчет содержания аскорбиновой кислоты производится по формуле (44).

---

[1] Чтобы уменьшить расход реактива и предупредить по возможности поступление сероводорода в помещение, рекомендуется вместо аппарата Киппа для получения сероводорода пользоваться следующей упрощенной установкой. Берут небольшую баночку, примерно на 250 мл, с широким горлом, в которое вставляют пробку. На дно в баночку кладут сернистое железо слоем толщиной в два пальца. В пробке делают два отверстия: одно для небольшой делительной воронки, куда наливают техническую соляную кислоту (крепкая кислота разводится 1:1), другое — для отводной стеклянной трубочки, согнутой под углом. Эта трубочка соединяется с маленькой колбочкой или бюксом (играющими роль клапана) с водой, которые соединены в свою очередь с сосудом, содержащим анализируемый экстракт. Выделяющийся из последнего в ходе анализа сероводород отводят в склянку (коническую колбу) с 5—10% едкой щелочью, где он и поглощается. Чтобы избежать лишней траты соляной кислоты, в промежутке между анализами соляную кислоту сливают с сернистого железа в специальную склянку с притертой пробкой и сернистое железо заливают водой.

[2] Пробу на сероводород с помощью бумажки, смоченной раствором уксуснокислого свинца, нельзя считать достаточно чувствительной, так как некоторое количество оставшегося в экстракте сероводорода может быть ею и не уловлено. Поэтому, чтобы уменьшить процент ошибки, надо особенно тщательно подбирать условия анализа (навеску, разведение, объем, взятый для титрования) так, чтобы титрационные числа были не меньше 1 мл.

ОСОБЕННОСТИ АНАЛИЗА НЕКОТОРЫХ ОБЪЕКТОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АРБИТРАЖНЫХ МЕТОДОВ

Определение аскорбиновой кислоты в окрашенных объектах

При анализе на содержание витамина С некоторых окрашенных продуктов применение уксуснокислого свинца иногда ведет к такому освобождению от пигментов, что титрование не встречает затруднений. Однако большей частью такого результата не получается, поэтому применяется один из следующих приемов:

а) Увеличение объема титруемой жидкости до 30 мл путем прибавления дистиллированной воды.

б) Титрование со «свидетелем» — сопоставление при титровании окрасок титруемой жидкости и жидкости, приготовленной для титрования («свидетель»). В целях такого сравнения сосуды, содержащие обе эти жидкости, ставят рядом при одинаковых условиях освещения.

в) Увеличение количества 5% раствора уксуснокислого свинца и соответственно углекислого кальция вдвое, втрое или даже вчетверо. Если при указанных выше условиях обесцвечивания центрифугата или фильтрата достигнуто все же не было, то проводят обработку его сероводородом.

При этой модификации анализа в формуле вычисления результатов коэффициент 1,5 переходит соответственно в 2,0; 2,5 или 3.

г) Обработка сероводородом.

Определение аскорбиновой кислоты в витаминизированных хлебных изделиях

С-витаминная активность витаминизированных хлебных изделий вычисляется по их редуцирующей способности за вычетом численно выраженной редуцирующей способности контрольных изделий, приготовленных по той же рецептуре и тем же способом, что и витаминизированные. Ввиду того что переход витамина С из хлебных изделий в экстрагирующую жидкость происходит медленно, следует применять троекратную экстракцию витамина С.

Из средней пробы хлеба берут навеску не менее 60 г; для первоначальной экстракции употребляют трое-

кратное количество 5% раствора уксусной кислоты, в которой хлеб тщательно растирают. После центрифугирования экстракта к осадку приливают уксусную кислоту в 3 раза меньшем количестве, чем в первый раз, производят центрифугирование экстракта и к осадку вновь приливают такое же количество кислоты, как и во второй раз, после чего производят третье центрифугирование. Перед каждым центрифугированием осадок тщательно перемешивают с экстрагирующей жидкостью. Каждое из трех центрифугирований должно происходить в течение 10—15 минут. Все центрифугаты сливают вместе.

В тех случаях, когда нельзя применять центрифугирование, применяют фильтрование экстрактов через вату, затем экстракты обрабатывают обычным порядком, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ввиду того что активность витаминизированных хлебных изделий обычно невысока, для титрования надлежит брать около 10 мл экстракта. Экстракт в большинстве случаев мутноват, поэтому при титровании его необходимо хорошо взбалтывать, так как взвешенные частицы хорошо задерживают краску.

Чтобы получить прозрачный экстракт, можно применить обработку его сероводородом, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты с применением сероводорода. При этом к уксуснокислому экстракту предварительно перед введением в него углекислого кальция прибавляют 3—5 мл чистого спирта.

Определение аскорбиновой кислоты в сульфитированном сушеном картофеле и других сульфитированных продуктах

Из средней пробы сушеного сульфитированного картофеля берут 70—100 г и измельчают в лабораторной мельнице или ступке. Из полученной массы взвешивают на технохимических весах две-три навески по 10 г. Каждую навеску переносят в ступку, туда же добавляют примерно 10 г стеклянного порошка и тщательно растирают в ступке с 5% раствором уксусной кислоты, взятой не менее чем в десятикратном количестве относительно навески. После настаивания производят центрифугиро-

вание экстракта в течение 10—15 минут и даже больше. При отсутствии центрифуги экстракт может быть отфильтрован.

Из центрифугатов или фильтратов, обычно очень мутных, берут по 20 мл и прибавляют последовательно 1,6 г углекислого кальция и 20 мл 5% раствора уксуснокислого свинца. После быстрого одно-двухминутного центрифугирования или фильтрования центрифугат или фильтрат обрабатывают сероводородом в течение 5 минут, причем совершенно необходимо, чтобы ток сероводорода шел быстро и чтобы обрабатываемый экстракт в самом начале пропускания сероводорода был энергично взболтан. После этого анализ производят в том же порядке, как при определении аскорбиновой кислоты с применением сероводорода.

Сернистая кислота полностью выводится из уксуснокислых экстрактов ацетатом свинца.

Определение витамина С в готовых блюдах

В зависимости от состава и консистенции готовых блюд проводят соответствующую подготовку материала к анализу.

При анализе первых блюд взвешивают общее количество блюда. Жидкую часть отцеживают через волосяное сито или марлю и определяют вес или объем жидкости. Вес твердой части устанавливают по разности. Твердую часть быстро растирают в ступке до однородной консистенции. Навеску твердой части блюда берут весом 20—50 г, жидкой — 20—50 мл. Суп-пюре анализируют без разделения на твердую и жидкую части.

Для анализа вторых блюд берут навески не менее 20—50 г каждая. Анализируют, как плотную часть первых блюд.

Третьи блюда анализируют соответственно консистенции — как первые или как вторые блюда.

Ввиду возможного наличия в блюдах дегидроаскорбиновой кислоты они анализируются по арбитражному методу с применением сероводорода.

Анализ готовых блюд отличается следующими особенностями.

Уксуснокислые экстракты картофельных изделий и супов-пюре, дающие при анализе мельчайшие взвеси,

для получения «первоначальных экстрактов» перед обработкой углекислым кальцием и уксуснокислым свинцом подвергают длительному (не менее 15 минут) центрифугированию.

При условии низкого содержания витамина С в анализируемых блюдах поступают так, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода (см. примечание).

Можно также применять при титровании не 0,001 N раствор краски, а раствор вдвое меньшего титра.

В том случае, если при обработке сероводородом осадок сернистого свинца проходит через фильтр, «первоначальный экстракт» разводят вдвое или более 5% раствором уксусной кислоты и берут затем для анализа не 10 мл, а больше — в соответствии с пропорциональным увеличением углекислого кальция и уксуснокислого свинца. Такое увеличение общего объема позволяет затем брать для титрования большие количества жидкости[1].

Произведенное разведение экстракта учитывают при вычислении.

Определение витамина С в свежих растительных продуктах

Многие свежие растительные продукты содержат аскорбиназу, вследствие чего при извлечении витамина С уксусной кислотой из измельченного материала в нем может образоваться дегидроаскорбиновая кислота. Поэтому анализы необходимо вести с применением сероводорода.

Взятие навесок производят следующим образом. При анализе листового материала (крапива, щавель, шпинат и пр.) навеску ввиду его неоднородности берут в количестве не менее 20—30 г. При анализе плодов некрупного размера (сливы, абрикосы и пр.) на одну навеску берут целый плод. При анализе ягод (клюква, смородина и пр.) берут навеску в количестве 20 г. При анализе картофеля берут не весь клубень, а часть его весом 10—20 г, вырезанную наподобие апельсинной

---

[1] Указанная рекомендация не всегда дает положительный эффект.

дольки. При анализе капустного кочана поступают так же, но навеску берут в количестве не менее 50 г.

Для точной характеристики С-витаминной активности каких-либо плодоовощей или зелени рекомендуется использовать так называемый метод больших чисел (проводят несколько десятков и даже до сотни определений), чтобы нивелировать случайные колебания в содержании витамина в анализируемом материале, обрабатывая затем полученные данные методом вариационного анализа.

Содержание витамина С в сырых растительных объектах ориентировочно может быть определено и по упрощенному методу, излагаемому ниже.

УПРОЩЕННЫЙ (КОНТРОЛЬНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С[1]

Принцип метода

Витамин С, экстрагированный из анализируемого материала 2% раствором соляной кислоты, титруют непосредственно 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола в кислой среде без предварительной обработки углекислым кальцием и уксуснокислым свинцом.

При анализе плодов шиповника и молока в качестве экстрагирующей жидкости употребляют дистиллированную воду.

Применимость метода

Метод применим для анализа готовых блюд, сырого растительного материала, различных витаминных препаратов и плодоовощных консервов.

В табл. 5 (стр. 143—144) указаны объекты, дающие при анализе по упрощенному методу расхождение в сравнении с точными методами лишь в пределах ±10%.

---

[1] Контрольные методы применяют тогда, когда требуется быстрота определений и допускается точность анализа в пределах ± 10%, а при массовых анализах готовых блюд и консервов — в пределах ± 20%.

Контрольных методов два: один из них носит название упрощенного (сюда же относится так называемый хлороформный метод, не вошедший в ВТУ и ГОСТ), другой — йодатного.

При анализе готовых блюд расхождение может достигать ± 20%.

В том случае, если по отношению к данному объекту не имеется указаний, какими методами следует пользоваться при его анализе, применение упрощенного метода требует предварительного проведения параллельных анализов с использованием точных методов определения аскорбиновой кислоты с применением и без применения сероводорода. Если при анализе упрощенным методом расхождения с точными методами не выходят за пределы, допустимые для технического анализа (±20%), в дальнейшем можно пользоваться только упрощенным методом как более легким и более доступным. При анализе витаминных препаратов упрощенным методом расхождения с точными методами не должны превышать ±10%.

Упрощенный метод неприменим при исследовании сушеных и интенсивно окрашенных объектов.

Аппаратура

Та же, что указана в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

Те же, что указаны в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Реактивы

1. Кислота соляная, 2% раствор (берут 45,1 мл соляной кислоты удельного веса 1,19 и доводят дистиллированной водой до объема 1 л).

2. Натриевая соль 2,6-дихлорфенолиндофенола, 0,001 N раствор.

Остальные реактивы те же, что и при определении аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

Производится так же, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Подготовка материала к анализу

Такая же, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ход анализа

Экстракция и техника титрования те же, что указаны в соответствующих разделах метода определения аскорбиновой кислоты без применения сероводорода, за исключением того, что для экстракции употребляется 2% раствор соляной кислоты или дистиллированная вода.

Из центрифугата или фильтрата солянокислых экстрактов, полученных из объектов твердой или густой консистенции (2% раствор соляной кислоты употребляется в кратном соотношении к навеске, но не менее 3 мл на 1 г), берут пипеткой по 1—10 мл в зависимости от содержания аскорбиновой кислоты, определенного пробным титрованием, вносят в две-три конические колбы емкостью 50—100 мл, в которые заранее налито по 1 мл 2% раствора соляной кислоты и такое количество дистиллированной воды, чтобы общий объем жидкости равнялся 15 мл, после чего титруют 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Жидкие объекты непосредственно перед титрованием разводят соляной кислотой в соотношении не менее 1 : 1 или титруют без разведения. В последнем случае титрование производят в присутствии 1 мл 2% раствора соляной кислоты.

Титрование считается законченным при появлении розового окрашивания, удерживающегося 0,5—1 минуту. В случае правильно установленного конца титрования прибавление последовательно двух избыточных контрольных капель краски должно дать интенсивное розовое окрашивание. Навески, разведение, объем титруемого экстракта необходимо подобрать так, чтобы количество затраченной на титрование краски было по возможности не менее 1 мл и не более 2 мл. Титрование проводится в определенном объеме жидкости и в сосуде с определенной нижней поверхностью.

Особенности анализа плодов шиповника. Для определения витамина С в целых сухих и очищенных плодах шиповника берут пробу весом около 100 г и мелко

растирают в ступке. Для анализа из полученной массы отвешивают на технохимических весах две-три навески соответственно по 10 и 20 г каждая[1]. Навески переносят в ступку с заранее насыпанным туда стеклянным порошком в количестве около 5 г. Тщательно, осторожно и возможно более мелко растирают их, подливая небольшими порциями заранее отмеренные 300 мл дистиллированной воды комнатной температуры, и затем настаивают в течение 10 минут. Полученную смесь после тщательного размешивания центрифугируют или фильтруют через слой ваты.

От 1 до 5 мл центрифугата или фильтрата, в зависимости от С-витаминной активности исследуемого материала, установленной пробным титрованием, переносят пипеткой в две-три конические колбы на 50—100 мл, куда заранее налито по 1 мл 2% раствора соляной кислоты. Затем прибавляют такое количество дистиллированной воды, чтобы общий объем жидкости в колбочке был равен 15 мл, и титруют раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола. В случае окрашенности центрифугата или фильтрата, мешающей уловить появление розового окрашивания, а также при высокой С-витаминной активности продукта, обнаруженной пробным титрованием, центрифугаты или фильтраты разводят перед титрованием в два или более раз водой.

Плоды вяленого шиповника измельчают сначала в мясорубке, а затем в ступке со стеклом.

При анализе незрелых плодов шиповника, содержащих аскорбиназу, для экстракции вместо воды употребляют 2% раствор соляной кислоты. Далее анализ ведут так, как указано для целых сухих и очищенных плодов шиповника.

Особенности анализа витаминных препаратов (драже и таблеток). Средняя проба исследуемой партии препарата должна составлять не менее 30—50 штук; средний вес отдельной штуки определяют, исходя из этих или из еще бо́льших чисел. После определения среднего веса драже или таблеток их среднюю пробу растирают в

---

[1] Навески 10 и 20 г указаны в ГОСТ 7047-54 для арбитражного анализа. Для анализа обычного характера указаны соответственно навески 5 и 10 г. В последнем случае при экстракции витамина употребляют и пропорционально меньшие количества экстрагирующей жидкости.

ступке и из растертой массы берут две-три навески весом 1—2 г. Каждую навеску растирают в ступке, подливая небольшое количество 2% раствора соляной кислоты. Затем переводят содержимое ступки в мерную колбочку на 100 мл, ступку тщательно ополаскивают несколько раз 2% раствором соляной кислоты и промывную жидкость также сливают в мерную колбу. После растворения навески уровень жидкости в колбе доводят до метки. Допускается непосредственный перенос навесок хорошо растворяющихся драже и таблеток в мерную колбу для растворения в ней и настаивания. Для перемешивания жидкости колбу несколько раз перевертывают, закрыв пробкой. При высокой концентрации аскорбиновой кислоты производят добавочное разведение перемешанной жидкости 2% раствором соляной кислоты. Затем из полученного перемешанного материала берут пипеткой по 1—2 мл для титрования и вливают в две-три конические колбы, куда заранее налито по 1 мл 2% раствора соляной кислоты. Объем жидкости в колбах доводят дистиллированной водой до 15 мл и титруют.

Особенности анализа первых и вторых блюд. Готовое первое блюдо взвешивают на технических весах. Жидкую часть отделяют от твердой путем процеживания через волосяное сито или марлю; процеженную часть взвешивают и по разности весов блюда и жидкости определяют вес твердой части.

20—50 мл жидкой части блюда охлаждают в струе воды и для ориентировочного титрования берут 1—10 мл. Отмеренную жидкость при осторожном взбалтывании титруют в конической колбе емкостью 50—100 мл в присутствии 1 мл 2% раствора соляной кислоты и дистиллированной воды, взятой в таком количестве, чтобы общий объем жидкости равнялся 15 мл. Если жидкость окрашена, объем ее доводят до 20—30 мл[1].

Титрование производят не менее чем в двух-трех параллельных пробах жидкой части блюда.

Твердую часть супа полностью переносят в ступку и растирают в ней возможно быстрее и тщательнее. При

---

[1] При очень низком содержании витамина С можно брать для титрования 10—15 мл жидкой части блюда. Общий объем титруемой жидкости после добавления 1 мл 2% раствора соляной кислоты и дистиллированной воды должен составлять 20 мл.

наличии трудно растираемых частей (свекла и пр.) можно их предварительно нарезать на мелкие части никелированным ножом.

Из растертой массы берут две-три навески весом 20—50 г и заливают каждую из них не менее чем троекратным количеством 2% раствора соляной кислоты; кислоту подливают постепенно при одновременном размельчении объекта, после чего смесь оставляют стоять на 10 минут для наиболее полного извлечения витамина С. По истечении этого времени производят вновь тщательное и быстрое перемешивание навески в соляной кислоте, центрифугируют или отфильтровывают некоторую часть экстракта через гигроскопическую вату и титруют так же, как титровалась жидкая часть блюда. Супы типа пюре анализируют без разделения на жидкую и плотную часть. Для анализа берут навеску в количестве 20—50 г.

Вторые блюда анализируют так же, как плотную часть супа.

Третьи блюда анализируются соответственно их характеру — как первые или как вторые блюда.

Примечание. Анализ первых блюд без разделения их на жидкую и плотную часть не допускается в связи с возможной неоднородностью плотной части, трудностью измельчения неоднородных частей в общей массе супа и невозможностью вследствие этого получения точной навески взвеси. Навеска взвеси не будет точной и в том случае, если твердая часть была предварительно отделена от жидкой, растерта, а затем вновь введена в нее.

Помимо жидкой части супа, следует анализировать и его плотную часть, содержание витамина С в которой может превышать 30% общего количества витамина в супе.

Настаивание измельченного материала в экстрагирующей витамин С жидкости должно продолжаться не менее 10 минут, в противном случае не будет гарантировано полное извлечение витамина (титрование окрашенных объектов см. стр. 118).

Особенности анализа женского и коровьего натурального молока. Определение аскорбиновой кислоты в женском, коровьем натуральном молоке и в молозиве производится путем титрования в кислой среде 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола без предварительного осаждения белков. 10—15 мл женского или коровьего натурального молока разводят в 3 раза дистиллированной водой, а такое же количество молозива — от 3 до 6 раз. При разведении молоко отмеривают пипеткой, а дистиллированную воду наливают из бюретки.

5 мл разведенного молока вносят пипеткой в коническую колбу на 25—50 мл, куда заранее наливают 1 мл 2% раствора соляной кислоты, и доводят дистиллированной водой до объема 15 мл. Затем, взбалтывая, содержимое колбы титруют из микробюретки титрованным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола, приливая его по каплям до появления слабо розового окрашивания, удерживающегося в течение 0,5—1 минуты. Повторяют снова титрование одной-двух проб из той же порции разведенного молока. Разница в показании микробюретки при повторном титровании не должна превышать 0,02—0,03 мл. Титрационные числа записывают и из них вычисляют среднее.

После этого производят «слепой» опыт титрования.

Для «слепого» титрования 2% раствор соляной кислоты берут в таких же количествах, как указано выше, и вместо молока добавляют дистиллированную воду. Количество краски, пошедшей на «слепое» титрование, вычитают из того среднего количества краски, которое было израсходовано на титрование разведенного молока.

Примечание. Анализ женского молока желательно производить тотчас после сцеживания; если этого сделать нельзя, сосуд с молоком необходимо плотно закрыть резиновой пробкой и хранить в темном месте, так как витамин С на свету разрушается.

Особенности анализа коровьего молока, приготовленного из молочного порошка. Определение аскорбиновой кислоты в коровьем молоке производится после осаждения белков 2% раствором соляной кислоты и титрования сыворотки молока 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола.

Для ускорения осаждения белков в молоко прибавляют около 0,5% порошка хлористого кальция.

На каждый анализ молока в стаканчик емкостью 50—100 мл предварительно отвешивают 0,2 г хлористого кальция, затем туда же отмеривают пипеткой 30 мл коровьего молока и к нему приливают 18 мл 2% раствора соляной кислоты. Смесь после размешивания фильтруют через беззольный или простой, предварительно промытый 2% раствором соляной кислоты и высушенный фильтр. Для титрования берут от 2 до 5 мл фильтрата и добавляют к нему дистилированной воды до общего объема 15 мл.

При проведении «слепого» опыта вместо молока титруют 14 мл дистиллированной воды с добавлением 1 мл 2% раствора соляной кислоты.

Особенности анализа кефира[1]. Анализ кефира производится так же, как анализ объектов твердой консистенции по упрощенному методу.

При анализе кефира берут навеску от 30 до 50 г, добавляют 2% раствор соляной кислоты, соответственно 60 или 150 мл, все растирают при помешивании и настаивают в течение 10 минут; после фильтрования смеси через вату или ее центрифугирования для титрования 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола берут в колбочку от 3 до 5 мл фильтрата и добавляют дистиллированной воды до общего объема 15 мл.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты в кефире вычисляют по следующей формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot V_2 \cdot 0{,}088 \cdot 100}{V_3 \cdot g}; \qquad (45)$$

обозначения те же, что и в формуле (44).

Расчет содержания аскорбиновой кислоты в женском и коровьем натуральном молоке производят по формуле:

$$x = \frac{V \cdot F \cdot c \cdot 0{,}088 \cdot 100}{5}, \qquad (46)$$

где x — количество аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах; V — количество краски, пошедшей на титрование, за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; F — поправка на титр краски; c — число, выражающее разведение (например, при разведении молока в соотношении 1 : 2 — разведение 3, при разведении в соотношении 1 : 5 — разведение 6 и т. д.); 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, восстанавливающее 1 мл точно 0,001 N раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, в миллиграммах; 5 — количество разведенного молока, взятого для титрования, в миллилитрах; 100 — коэффициент для пересчета в проценты.

---

[1] Описанный метод применим и для анализа неокрашенных киселей густой консистенции.

Содержание аскорбиновой кислоты в молоке, приготовленном из молочного порошка, вычисляют по формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot 48 \cdot 0{,}088 \cdot 100}{V_2 \cdot 30}, \qquad (47)$$

где x — количество аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах; V_1 — количество краски, пошедшей на титрование, за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; F — поправка на титр краски; 48 и 30 — постоянные числа (30 мл молока + 18 мл 2% раствора соляной кислоты); V_2 — количество молока, взятого для титрования, в миллилитрах; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, восстанавливающее 1 мл точно 0,001 N раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, в миллиграммах.

ХЛОРОФОРМНЫЙ (КОНТРОЛЬНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С

Данный метод не является стандартным методом, но обладает достаточной точностью, позволяющей рекомендовать его применение.

Принцип метода

Метод основан на титровании аскорбиновой кислоты 2,6-дихлорфенолиндофенолом в присутствии хлороформа, который обладает способностью извлекать из водных растворов малейшие количества аскорбиновой кислоты. Пигменты растительного происхождения, которые обусловливают розово-красную окраску пищевых экстрактов, в хлороформ, за редкими исключениями, не переходят.

Применимость метода

Хлороформным методом следует пользоваться в основном тогда, когда лаборатория не располагает сероводородной установкой для проведения анализа по точному методу. К объектам, содержащим зелено-желтые пигменты (хлорофилл, ксантофил и др.), этот метод не применим. В этом случае пользуются арбитражным методом. Хлороформный метод не является стандартным методом, но обладает достаточной точностью.

Аппаратура

Та же, что указана в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

Те же, что указаны в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Реактивы

Хлороформ.

Остальные реактивы те же, что указаны в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

Проба на чистоту хлороформа. Проверка чистоты хлороформа состоит в проведении реакции с азотнокислым серебром в небольшой пробирке. Для этого к 2 мл хлороформа прибавляют 5—10 капель 2% раствора азотнокислого серебра. Если после энергичного перемешивания верхний водный слой становится мутным или опалесцирующим — это указывает на недоброкачественность хлороформа и на необходимость его очистки или замены. Очистка хлороформа производится путем его троекратного промывания в делительной воронке водой, взятой в отношении 1 : 1, с последующей перегонкой его с дефлегматором при температуре 60°.

Приготовление остальных растворов, установка их титров и очистка реактивов производятся так же, как описано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Подготовка материала к анализу

Проводится так же, как описано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ход анализа

Титрование в присутствии хлороформа проводится в обычных лабораторных пронумерованных пробирках (10 × 130 мм или 15 × 150 мм) с подобранными к ним корковыми пробками.

Предварительно в двух пробирках из микробюретки титруют экстракт витамина С 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола без хлороформа со «свидетелем», используя стеклянную палочку с загнутым концом для размешивания жидкости в первой пробирке. Вторая пробирка является «свидетелем». Для титрования в этих условиях в обе пробирки вводят 1—3 мл окрашенного солянокислого экстракта и 10 мл воды и титруют раствор в первой пробирке 0,001 N раствором 2,6-дихлорфенолиндофенола до появления более интенсивной окраски по сравнению с окраской во второй пробирке («свидетель»).

Установив таким образом приблизительное количество индикатора, требующегося для окисления аскорбиновой кислоты во взятом объеме экстракта, приступают к уточненному титрованию в присутствии хлороформа. Для этого в 6—7 пробирок, помещенных на штативе, вводят по 3 мл хлороформа, к которому затем добавляют 1—3 мл исследуемого солянокислого экстракта и дистиллированной воды до общего объема 10 мл, не считая объема хлороформа.

Если анализу подвергают не солянокислый, а водный или уксуснокислый экстракт витамина С (борщ, напитки и пр.), то в счет добавляемого объема воды вводят 1 мл 2% раствора соляной кислоты.

Затем содержимое первой из взятых пробирок, плотно закрытой пробкой, перемешивают путем перевертывания пробирки, причем окраска слоя хлороформа должна сохраняться бесцветной (эта пробирка служит контрольной для сравнения с ней окраски хлороформа в остальных 5—6 пробирках[1]).

---

[1] Слой хлороформа в первой пробирке, не содержащий 2,6-дихлорфенолиндофенола, может окраситься только в следующих случаях: а) если после взбалтывания пробирки два слоя, водный и хлороформный, разделяются не сразу, а в течение 5—10 минут отстаивания; б) если экстракт содержал жир, который не был предварительно удален центрифугированием; в) если употреблен хлороформ плохого качества; г) если пигмент экстракта способен перейти в хлороформ (зелень, свежие томаты).

В следующую пробирку вводят из микробюретки то количество 2,6-дихлорфенолиндофенола, которое было установлено предварительным титрованием.

Затем водный слой, начиная с его верхней части, тщательно размешивают стеклянной палочкой с загнутым концом, после чего все содержимое пробирки смешивают регулярным трех-четырехкратным перевертыванием, плотно закрыв ее корковой пробкой. После этого пробирку следует приоткрыть для удаления из нее газообразного хлороформа. Окраску слоя хлороформа устанавливают на фоне белой бумаги, сравнивая с первой пробиркой после одно-двухминутного отстаивания ее содержимого для разделения слоев.

Если хлороформный слой во второй пробирке окажется слабо окрашенным, то в третью пробирку добавляют из микробюретки меньшее, чем в предыдущем случае, количество индикатора и снова его размешивают в водном слое и затем встряхивают вместе с хлороформом. Так поступают с каждой последующей пробиркой до тех пор, пока в последней пробирке хлороформ станет бесцветным, т. е. окраска его будет совпадать с таковой содержимого первой пробирки. Рекомендуется, чтобы титрационные числа для последних пробирок отличались одно от другого не более чем на 0,1 мл индикатора.

«Слепой» опыт при принятых условиях проведения анализа дает обычно поправку в 0,05 мл краски.

Она устанавливается в отдельной пробирке при присоединении к хлороформу одних реактивов с введением 1—2 капель 0,001 N раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола, который смешивается с остальным раствором в вышеописанном порядке.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле (45).

ЙОДАТНЫЙ (КОНТРОЛЬНЫЙ) МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С

Принцип метода

Витамин С, экстрагированный 2% раствором соляной кислоты, титруют 0,01 или 0,001 N раствором йодноватокислого калия (KJO_3).

Применимость метода

Метод применим для анализа препаратов синтетической аскорбиновой кислоты и ее растворов в качестве арбитражного метода, а для анализа драже и таблеток, плодов шиповника, их настоев, натуральных продуктов их переработки (таблетки, порошки), а также для анализа хвои и ее настоев — в качестве контрольного метода.

По сравнению с арбитражным йодатный метод дает обычно завышенные результаты. Метод совершенно неприменим для анализа сушеных и интенсивно окрашенных объектов, а также для анализа сырого картофеля.

Аппаратура

Та же, что указана в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

Те же, что указаны в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Реактивы

1. Калий йодистый, 1% раствор.
2. Калий йодноватокислый.
3. Калий йодноватокислый, 0,1, 0,01 и 0,001 N растворы.
4. Кислота соляная, 2% раствор.
5. Крахмал растворимый, 1% и 0,5% растворы.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

Производятся так же, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Подготовка материала к анализу

Производится так же, как указано в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ход анализа

Из центрифугата или фильтрата солянокислых экстрактов, полученных из объектов твердой или густой консистенции, берут пипеткой в зависимости от содержания витамина С, определенного пробным титрованием, 1—5 мл и вносят в коническую колбу емкостью 50—100 мл. В колбу заранее наливают 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала и столько дистиллированной воды, чтобы общий объем жидкости равнялся 10 мл. После этого жидкость титруют из бюретки 0,001 N раствором йодноватокислого калия до появления слабо синего окрашивания.

Жидкие объекты разводят непосредственно перед титрованием 2% раствором соляной кислоты или дистиллированной водой или титруют без разведения.

В последних случаях титрование производят в присутствии 1 мл 2% раствора соляной кислоты.

При анализе можно также пользоваться не 0,001 N, а 0,01 N раствором KJO_3.

Поправка на «слепой» опыт производится следующим образом: в коническую колбу наливают 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала, 1 мл 2% раствора HCl и столько дистиллированной воды, чтобы общий объем равнялся 10 мл, и титруют 0,001 N раствором KJO_3 до появления слабо синего окрашивания.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot V_2 \cdot 0{,}088 \cdot 100}{V_3 \cdot g}, \qquad (48)$$

где x — количество аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах; V_1 — количество 0,001 N раствора йодноватокислого калия, пошедшее на титрование за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; V_2 — объем, до которого доведена навеска при прибавлении к ней экстрагирующей жидкости, в миллилитрах; V_3 — количество экстракта, взятое для титрования, в миллилитрах; F — поправка на титр йодноватокислого калия для перевода его на 0,001 N раствор, равная единице при

употреблении точно 0,001 N раствора; g — навеска в граммах или объем в миллилитрах; 0,088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл точно 0,001 N раствора йодноватокислого калия, в миллиграммах.

ЙОДАТНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода

Аскорбиновую кислоту экстрагируют дистиллированной водой и титруют 0,1 N раствором йодноватокислого калия при индикаторе крахмале.

Аппаратура

1. Аналитические весы.
2. Разновесы.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

1. Бюксы.
2. Бюретки на 15—25 мл.
3. Колбы конические емкостью 50—100 мл.
4. Колбы для перегонки воды.
5. Ложки фарфоровые и алюминиевые.
6. Мерные колбы емкостью 100 мл.
7. Микробюретки на 1—2 мл.
8. Набор пипеток на 0,5—10 мл.
9. Стеклянные палочки или лопаточки.
10. Шпатель роговой или фарфоровый.
11. Штативы металлические с набором лапок.

Реактивы

1. Калий йодистый.
2. Калий йодистый, 1% раствор.
3. Калий йодноватокислый, 0,1 N раствор.
4. Калий йодноватокислый.
5. Кислота соляная, 2% раствор.
6. Крахмал растворимый, 0,5% раствор.

Приготовление растворов, установка титров и очистка реактивов

Приготовление растворов см. в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Подготовка материала к анализу

Для анализа берут среднюю пробу аскорбиновой кислоты.

Ход анализа

Среднюю пробу аскорбиновой кислоты, подлежащую анализу, высыпают в стаканчик с притертой пробкой или бюкс, где ее тщательно перемешивают палочкой или лопаточкой. Из перемешанной массы берут три навески весом около 1 г. Взвешивание производят на аналитических весах с точностью до 0,002 г. Каждую навеску переводят количественно в мерную колбочку с притертой пробкой на 100 мл, где она растворяется в дистиллированной воде, перегнанной в аппаратуре из стекла. После растворения аскорбиновой кислоты жидкость в колбочке доводят до метки. Содержимое колбочки перемешивают путем переворачивания последней и берут на анализ. Перед титрованием в две-три конические колбы емкостью 50—100 мл вносят пипеткой по 10 мл полученного раствора аскорбиновой кислоты, 0,5 мл 1% раствора йодистого калия, 2 мл 0,5% раствора крахмала и по 1 мл 2% раствора соляной кислоты. Титрование производят 0,1 N раствором йодноватокислого калия из макробюретки до появления стойкого слабо синего окрашивания. Титрационные числа при повторных титрованиях не должны отличаться друг от друга более чем на 0,03 мл. Из полученного среднего титрационного числа вычитают поправку на «слепой» опыт, которая в указанных выше условиях анализа лежит обычно в пределах 0,01—0,02 мл.

Для проведения «слепого» опыта в коническую колбу вместо 10 мл раствора аскорбиновой кислоты вносят 10 мл дистиллированной воды; остальные реактивы те же. Титрование производят из микробюретки до появления слабо синего окрашивания.

Определение содержания синтетической аскорбиновой кислоты производится: 1) йодатным и 2) йодометрическим методом. В качестве арбитражного метода пользуются только йодатным.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$x = \frac{(V - a) \cdot F \cdot V_1 \cdot 0{,}0088 \cdot 100}{V_2 g}, \qquad (49)$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в грамм-процентах; V — количество 0,1 N раствора йодноватокислого калия, пошедшее на титрование, в миллилитрах; a — поправка на «слепой» опыт в миллилитрах; F — поправка на титр раствора йодноватокислого калия, равная единице, если раствор йодноватокислого калия точно 0,1 N; V_1 — объем, до которого доведена навеска, в миллилитрах; 0,0088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 N раствора йодноватокислого калия, в граммах; g — навеска в граммах; V_2 — количество анализируемого раствора, взятого для титрования, в миллилитрах.

Результаты параллельных определений в навесках аскорбиновой кислоты, из которых берется среднее, не должны отличаться друг от друга более чем на 0,5%.

ЙОДОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИНТЕТИЧЕСКОЙ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Принцип метода

Аскорбиновую кислоту экстрагируют дистиллированной водой и титруют при индикаторе крахмале из макробюретки 0,1 N раствором йода.

Аппаратура

1. Весы аналитические.
2. Разновесы.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

Те же, что и при определении синтетической аскорбиновой кислоты йодатным методом.

Реактивы

1. Йод кристаллический.
2. Йод, 0,1 N раствор.
3. Калий йодистый, 50% раствор.
4. Крахмал, 0,5% раствор.

Приготовление растворов, очистка реактивов, установка титров

Приготовление рабочего раствора йода. Для приготовления 0,1 N раствора йода отвешивают 12,692 г свежевозогнанного йода и растворяют в 20 мл водного раствора йодистого калия, содержащегося в указанном объеме в количестве 20 г. После растворения йода раствор переводят в мерную колбу емкостью 1 л и содержимое колбы доводят дистиллированной водой до метки. 0,01 N раствор йода приготовляют по мере надобности путем разведения в 10 раз 0,1 N раствора йода дистиллированной водой.

Титр 0,1 N раствора йода устанавливают в день анализа по общим правилам объемного анализа. Растворы йода хранят в темном месте в хорошо закрытых склянках из темного стекла.

Приготовление остальных реактивов см. в разделе по определению аскорбиновой кислоты без применения сероводорода.

Ход анализа

Навеска аскорбиновой кислоты и способы ее разведения те же, что указаны на стр. 137.

В две-три конические колбы емкостью 50—100 мл вносят пипеткой по 10 мл раствора аскорбиновой кислоты, прибавляют по 2 мл 0,5% крахмала и титруют из микробюретки 0,1 N раствором йода до появления стойкого слабо синего окрашивания. Из полученного среднего титрационного числа вычитают поправку на «слепой» опыт.

Вычисление результатов анализа

Производят по формуле (49), где V — количество 0,1 N раствора йода, пошедшее на титрование раствора аскорбиновой кислоты, в миллилитрах.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЕЕ АМПУЛЬНЫХ ПРЕПАРАТАХ

Излагаемый ниже метод определения имеет некоторые отличия в зависимости от того, к какого рода ампульным препаратам он применяется.

Принцип метода

Экстракция аскорбиновой кислоты дистиллированной водой или 1% раствором соляной кислоты и титрование 0,01 или 0,1 N раствором йода при индикаторе крахмале.

Применимость метода

Метод применим к анализу следующих ампульных препаратов: 5% раствора аскорбината натрия, 10% раствора аскорбината натрия, 10% раствора аскорбиновой кислоты, 25% раствора аскорбиновой кислоты и 40% раствора глюкозы с 1% содержанием аскорбиновой кислоты.

Аппаратура

1. Аналитические весы.
2. Разновесы.

Посуда, материалы и лабораторные принадлежности

1. Бюретки на 15—25 мл.
2. Колбы конические на 50—100 мл.
3. Мерные колбы на 100 мл.
4. Микробюретки на 1—2 мл.
5. Набор пипеток на 0,5—10 мл.
6. Стеклянные палочки.
7. Сосуд с притертой пробкой.
8. Штативы металлические с набором лапок.

Реактивы

1. Йод металлический.
2. Йод, 0,01 и 0,1 N растворы.
3. Калий йодистый, 50% раствор.
4. Кислота соляная, 1% раствор.
5. Крахмал растворимый, 0,5% раствор.

Приготовление растворов, очистка реактивов и установка титров

Приготовление растворов см. в разделе йодометрического метода определения синтетической аскорбиновой кислоты.

Подготовка материала к анализу

Из средней пробы препарата аскорбиновой кислоты в ампулах берут для определения дважды по 5 ампул. Ампулы вскрывают непосредственно перед анализом, переливают их содержимое в сухой сосуд с притертой пробкой и тщательно перемешивают.

Ход анализа 5 и 10% растворов аскорбината натрия в ампулах

В коническую колбу на 100 мл вносят 2,5 мл 10% раствора аскорбината натрия или 5 мл 5% раствора аскорбината натрия, добавляют в нее 25 мл дистиллированной воды и 2 мл 0,5% раствора крахмала. Осторожно взбалтывая, титруют содержимое колбы из макробюретки 0,1 N раствором йода до появления синего, не исчезающего в течение 30 секунд окрашивания. Затем устанавливают поправку на «слепой» опыт. Для этого в коническую колбу наливают 2 мл 0,5% раствора крахмала и столько дистиллированной воды, чтобы получился объем, который был при титровании исследуемого объекта. Содержимое колбы титруют 0,1 N раствором йода до появления слабо синего окрашивания.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot 0{,}0088 \cdot 100}{V_3}, \qquad (50)$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в объемных процентах; V_1 — количество 0,1 N раствора йода, пошедшее на титрование, за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; F — поправка на титр раствора йода для перевода его на точно 0,1 раствор; V_3 — количество препарата, взятого для титрования в миллилит-

рах; 0,0088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,1 N раствора йода в граммах.

Ход анализа 10 и 25% растворов аскорбиновой кислоты в ампулах

В мерную колбу на 100 мл вносят пипеткой 1 мл препарата и доводят до метки 1% раствором соляной кислоты. Содержимое колбочки перемешивают путем ее переворачивания. 10 мл полученного раствора вносят пипеткой в коническую колбу на 50—100 мл, приливают 2 мл 0,5% раствора крахмала и титруют при осторожном взбалтывании из микробюретки 0,01 N раствором йода до появления стойкого слабо синего окрашивания. Затем производят поправку на «слепой» опыт. Для этого в коническую колбу наливают 10 мл 1% раствора соляной кислоты и 2 мл 0,5% раствора крахмала и титруют содержимое 0,01 N раствором йода до появления стойкого слабо синего окрашивания.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot V_2 \cdot 0{,}00088 \cdot 100}{V_3 \cdot V_4}, \qquad (51)$$

где x — содержание аскорбиновой кислоты в объемных процентах; V_1 — количество 0,01 N раствора йода, пошедшее на титрование, за вычетом поправки на «слепой» опыт, в миллилитрах; V_2 — объем, до которого разведено взятое на анализ количество препарата, в миллилитрах; V_3 — количество препарата, взятое на анализ, в миллилитрах; V_4 — объем взятого на титрование разбавленного раствора аскорбиновой кислоты в миллилитрах; F — поправка на титр йода для перевода его на точно 0,01 N раствор; 0,00088 — количество аскорбиновой кислоты, соответствующее 1 мл 0,01 N раствора йода, в граммах.

Ход анализа 40% раствора глюкозы с 1% содержанием аскорбиновой кислоты в ампулах

В мерную колбу на 100 мл вносят пипеткой 5 мл препарата и доводят свежепрокипяченной водой до метки. 10 мл полученного раствора наливают пипеткой

в коническую колбу на 50—100 мл, куда добавляют 2 мл 0,5% раствора крахмала. Содержимое колбы титруют, осторожно взбалтывая, 0,01N раствором йода до появления стойкого слабо синего окрашивания.

Для установления поправки на слепой опыт в коническую колбу наливают 10 мл свежепрокипяченной воды, 2 мл 0,5% раствора крахмала и титруют содержимое 0,01 N раствором йода до появления стойкого слабо синего окрашивания.

Вычисление результатов анализа

Содержание аскорбиновой кислоты вычисляют по формуле:

$$x = \frac{V_1 \cdot F \cdot V_2 \cdot 0{,}00088 \cdot 100}{V_3 \cdot V_4} \qquad (52)$$

Обозначения те же, что и в формуле (51).

ПРИМЕНИМОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА С В РАЗЛИЧНЫХ ОБЪЕКТАХ

Для того чтобы облегчить правильный выбор метода, который должен быть применен при анализе данного объекта, приводится табл. 5, где знак плюс (+) указывает на применимость метода, стоящего соответственно наверху, в рубриках таблицы, а знак минус (—) указывает, что соответствующий ему метод применен быть не может.

Таблица 5

Применимость методов определения витамина С в объектах

Наименование объекта	Арбитражный метод с H_2S	Модификация арбитражного метода (без H_2S)	Контрольные методы	
			упрощенный	йодатный
1. Драже и таблетки с витамином С . .	—	+	+	+
2. Драже и таблетки с витамином С и B_1	—	+	+	+
3. Драже поливитаминное	—	+	+	+
4. Таблетки витамина С с глюкозой . . .	—	+	+	+

Продолжение

Наименование объекта	Арбитражный метод с H_2S	Модификация арбитражного метода (без H_2S)	Контрольные методы	
			упрощенный	йодатный
5. Сироп из плодов шиповника витаминизированный . . .	—	+	+	—
6. Порошок и таблетки из плодов шиповника	—	+	+	+
7. Концентрат витамина С из плодов шиповника в порошке	—	+	+	+
8. Жидкие концентраты из плодов шиповника	—	+	+	—
9. Пюре из плодов шиповника	—	+	+	—
10. Конфеты витаминизированные	—	+	+	—
11. Плоды шиповника	—	+	+	+
12. Настой шиповника	—	+	+	+
13. Хвоя и свежеприготовленный настой из хвои	+	—	+	+
14. Настой из хвои, подвергшийся хранению	+	—	—	—
15. Концентрат из хвои	—	+	+	—
16. Соки консервированные	—	+	+	—
17. Соки консервированные интенсивно окрашенные и соки свежеотжатые . .	+	—	—	—
18. Консервы (растительные)	+	—	+	—
19. Свежие плоды, овощи и другой свежий растительный материал . . .	+	—	+	—
20. Сушеные продукты	+	—	—	—
21. Сушеный сульфитированный картофель	+	—	—	—
22. Чай витаминизированный	+	—	—	—
23. Блюда готовые . . .	+	—	+	—
24. Молоко	—	—	+	—
25. Хлеб витаминизированный	+	—	—	—

Для синтетической аскорбиновой кислоты арбитражным методом является йодатный, для препаратов аскорбиновой кислоты в ампулах — йодометрический.

Примечания. 1. В том случае, когда в таблице для данного продукта указан только арбитражный метод, последний применяется и как контрольный.

2. Не допускается анализировать свежие растительные продукты упрощенным методом, если они содержат большое количество дубильных веществ.

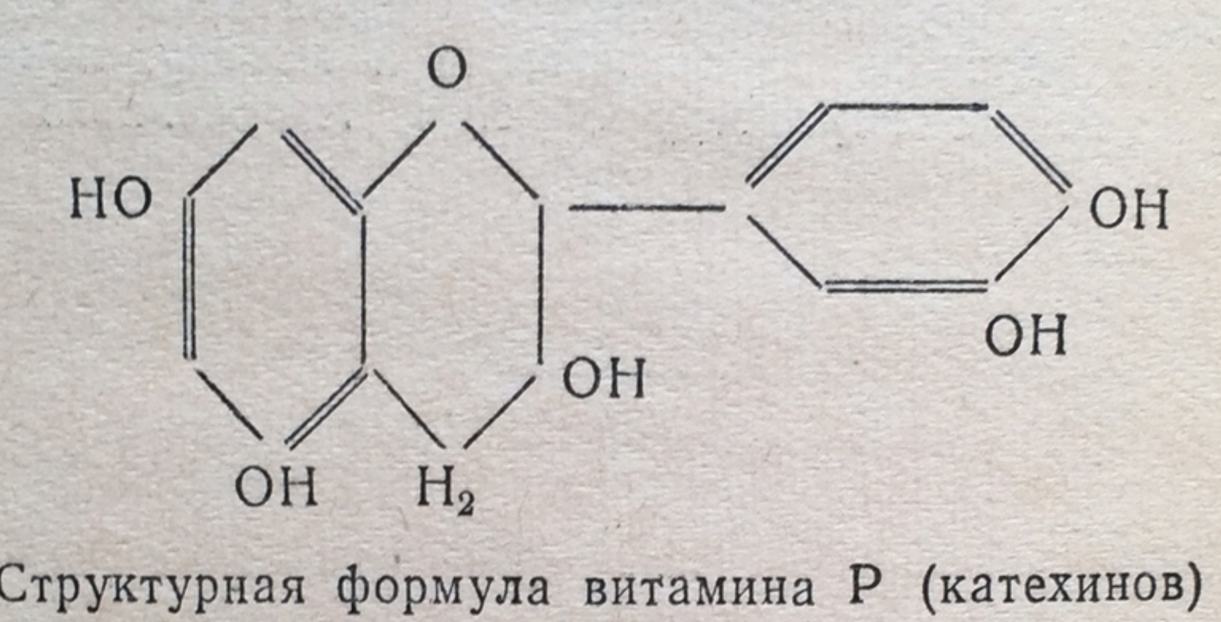
3. Молоко анализируется по видоизмененному упрощенному методу.

4. Для свежеотжатых соков (томатного, мандаринового и апельсинового) допускается применение упрощенного метода.

5. Предварительную подготовку и анализ не вошедших в таблицу продуктов производят по навеске и методу, принятому для соответствующего по характеру объекта, включенного в таблицу.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВИТАМИНА Р

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Р (КАТЕХИНОВ) В ПРЕПАРАТАХ ИЗ ЧАЙНОГО ЛИСТА



Структурная формула витамина Р (катехинов)

Основную массу препаратов витамина Р из чайного листа составляют чайные катехины и их производные (чайный танин).

В состав чайного танина входят: l-эпикатехин, d, l-катехин, l-эпигаллокатехин, d, l-галлокатехин, l-эпикатехингаллат, l-галлокатехингаллат и l-эпигаллокатехингаллат.

Химически чистые чайные катехины представляют собой бесцветные кристаллические вещества, хорошо растворимые в спирте и несколько хуже — в воде. Обладают горьковато-вяжущим вкусом.

Препараты витамина Р из листьев чая зеленого цвета имеют также горьковато-вяжущий вкус, хорошо растворяются и в воде, и в спирте. Сохраняются в течение 1—2 лет без значительной потери биологической активности при хранении их в герметической таре на холоду и в темноте.

Принцип метода

В основу определения катехинов положен метод Левенталя для определения дубильных веществ путем окисления их марганцовокислым калием.

Катехины экстрагируются из анализируемого материала дистиллированной водой. Водные растворы титруются 0,1N раствором $KMnO_4$ в присутствии индикатора индигокармина. Результаты титрования сравниваются со стандартным пересчетным коэффициентом титрования по Левенталю, равным 6,4 и представляющим собой количество миллиграммов 100% чайного танина, окисляемое 1 мл 0,1N раствора $KMnO_4$.

Применимость метода

Метод применяется для анализа препаратов витамина Р из листьев чая в виде порошка и в таблетках. Кроме того, метод можно применять для анализа некоторых растительных объектов, в которых дубильные вещества в основном представлены катехинами (например, для анализа черного и зеленого чая).

Аппаратура

1. Весы аналитические.
2. Весы технохимические.
3. Разновесы.
4. Сушильный шкаф.
5. Электроплитка.

Посуда

1. Бюксы небольшие.
2. Чашки фарфоровые выпаривательные диаметром 30—50 см.
3. Воронки диаметром 3—5 см.
4. Колбы конические емкостью 100 мл.
5. Колбы мерные емкостью 100 мл и 1 л.
6. Макробюретки на 10—25 мл.
7. Цилиндры мерные на 25, 100 и 500 мл.
8. Пипетки на 1—10 мл.
9. Обратный воздушный холодильник.
10. Ступки фарфоровые диаметром 10—20 см.

Реактивы

1. Вода дистиллированная.
2. $KMnO_4$, 0,1N раствор.
3. Раствор индигокармина.

4. Соляная кислота удельного веса 1,19—1,185.
5. Серная кислота концентрированная.
6. Щавелевокислый натрий или аммоний.
7. Фильтровальная бумага.

Приготовление растворов и установка титров

Для приготовления 0,1N раствора $KMnO_4$ навеску в 3,16 г, взятую на аналитических весах, растворяют в прокипяченной дистиллированной воде и по охлаждении доводят до метки в мерной колбе емкостью в 1 л. Поправку на титр раствора марганцовокислого калия устанавливают по химически чистому щавелевокислому натрию или аммонию. Навеску щавелевокислого натрия, взятую на аналитических весах в пределах 0,13—0,14 г, растворяют в 100 мл бидистиллированной воды, нагревают до температуры, близкой к кипению, затем приливают 2 мл HCl удельного веса 1,19—1,185 и титруют раствором $KMnO_4$ из бюретки.

Поправку (T) на титр марганцовокислого калия вычисляют по формуле:

$$T = \frac{d \cdot 1000}{6{,}7027 \cdot A}, \qquad (53)$$

где d — навеска щавелевокислого натрия в граммах; A — количество раствора $KMnO_4$, пошедшего на титрование раствора щавелевокислого натрия, в миллилитрах.

Раствор индигокармина приготовляют следующим образом. 1 г индигокармина растирают в фарфоровой ступке и растворяют в 50 мл концентрированной серной кислоты. Полученный раствор доводят дистиллированной водой до 1 л в мерной колбе и фильтруют через обычный бумажный складчатый фильтр. Раствор индигокармина рекомендуется хранить в склянке из темного стекла. Срок его годности 7—10 дней.

Подготовка материала к анализу

Среднюю пробу препарата витамина Р в порошке перед взятием навесок тщательно перемешивают.

Среднюю пробу таблеток с витамином Р в количестве 20—30 штук растирают в фарфоровой ступке и тщатель-

но перемешивают. Перед растиранием таблеток их взвешивают на технохимических весах и определяют средний вес одной штуки.

При анализе сухих растительных объектов чая их среднюю пробу также тщательно измельчают в порошок в фарфоровой ступке или кофейной мельнице.

Ход анализа

Навеску препарата в количестве 100 мг для витамина Р в порошке, взятую на аналитических весах, и навеску в количестве 3—3,5 г для препарата витамина Р в таблетках, отвешенную на технохимических весах, растворяют в дистиллированной воде. Раствор переносят в мерную колбу емкостью 100 мл и после тщательного перемешивания доводят до метки. Из приготовленного раствора на опытное титрование берут по 10 мл. Титрование проводят 0,1N раствором $KMnO_4$ следующим образом. В большую фарфоровую чашку наливают 500 мл дистиллированной воды, 25 мл раствора индигокармина и 10 мл раствора препарата. После приливания индигокармина содержимое чашки окрашивается в интенсивно синий цвет. Раствор марганцовокислого калия приливают из бюретки небольшими порциями, тщательно перемешивая жидкость в чашке стеклянной палочкой.

Конец титрования определяется появлением желтой окраски раствора через переходные цвета — от синего до зеленого и зеленовато-желтого.

При контрольных определениях титруют 500 мл воды с внесенным в нее в объеме 25 мл раствором индигокармина.

Разница между опытным и контрольным титрованием представляет собой количество миллилитров 0,1 N раствора марганцовокислого калия, идущее на окисление препарата (чайного танина).

При анализе сухих растительных объектов (чая) навеску в количестве 0,5 г заливают 200 мл нагретой до кипения воды и кипятят в течение 5 минут в колбе с обратным воздушным холодильником или с воронкой. Полученный экстракт остужают и затем титруют 10 мл экстракта, как указано выше.

При анализе испытуемых объектов рекомендуется для определения брать не менее двух навесок. При повторных титрованиях титрационные числа не должны отличаться друг от друга более чем на 0,02—0,04 мл. Разница в полученных данных между навесками не должна превышать 5%.

Вычисление результатов анализа

Содержание витамина Р в порошкообразных препаратах вычисляют путем сравнения его коэффициента титрования со стандартным коэффициентом по формуле:

$$\frac{6{,}4 \cdot 100}{A} = \%, \qquad (54)$$

где A — коэффициент титрования данного образца препарата, представляющий собой количество миллиграммов чайного танина, окисляемого 1 мл 0,1 N раствора $KMnO_4$.

Коэффициент титрования вычисляется по следующей формуле:

$$A = \frac{d \cdot V_2}{(a-b) \cdot T \cdot V_1}. \qquad (55)$$

Объединяя эти две формулы, получим:

$$x = \frac{(a-b) \cdot T \cdot 6{,}4 \cdot V_1 \cdot 100}{d \cdot V_2}, \qquad (56)$$

где x — содержание витамина Р в препарате в процентах; a — количество 0,1 N раствора $KMnO_4$, идущее на опытное титрование раствора препарата в миллилитрах; b — количество 0,1 N раствора $KMnO_4$, идущее на контрольное титрование воды и индигокармина, в миллилитрах; T — поправка на титр 0,1 N раствора $KMnO_4$; 6,4 — стандартный пересчетный коэффициент титрования, представляющий собой количество миллиграммов 100% чайного танина, окисляемое 1 мл 0,1 N раствора $KMnO_4$; V_1 — объем, в котором растворена взятая для анализа навеска, в миллилитрах; V_2 — объем раствора, взятого для титрования, в миллилитрах; d — навеска в миллиграммах.

Содержание витамина Р в таблетках вычисляется по несколько измененной формуле:

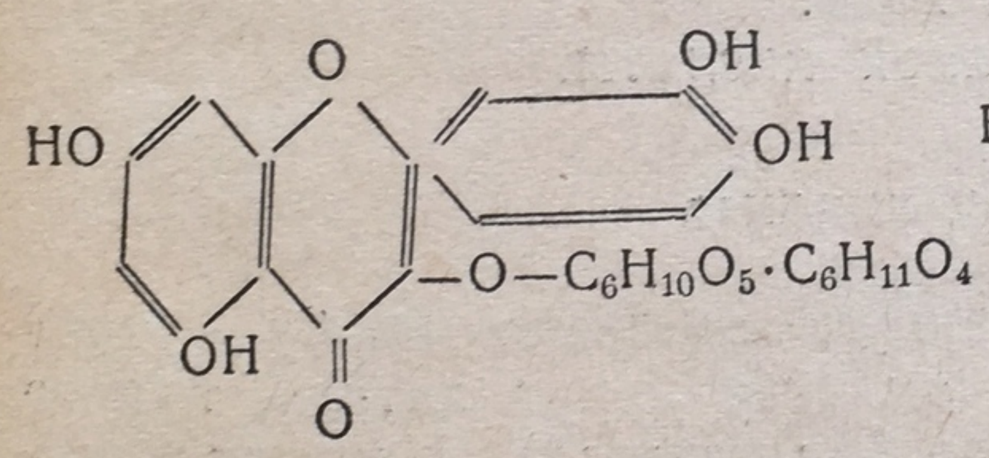
$$x = \frac{(a-b) \cdot T \cdot 6{,}4 \cdot V_1 \cdot d_2}{d_1 \cdot V_2}, \qquad (57)$$

где x — количество витамина Р в миллиграммах в одной таблетке; d_1 — навеска в граммах; d_2 — средний вес одной таблетки; остальные обозначения те же, что и в формуле (56).

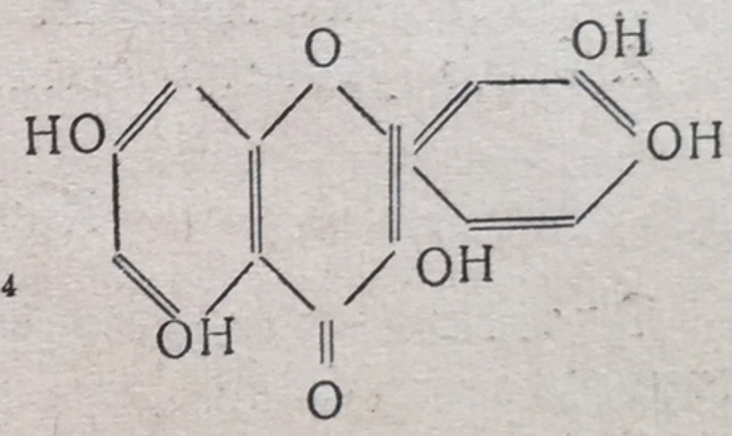
Содержание витамина Р в растительных объектах вычисляют в процентах по той же формуле, что и для препаратов витамина Р в порошке.

Метод позволяет оттитровывать катехины в водном растворе при минимальной концентрации их 10 мг%/л с точностью 97—100%. Наибольшая точность достигается при титровании 100 мг%/л растворов катехинов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВИТАМИНА Р (РУТИНА) В ЧИСТЫХ ПРЕПАРАТАХ



Структурная формула рутина



Структурная формула кверцетина

Рутин относится к группе флавонов и представляет собой кверцетин-3-рутинозид или рамноглюкозид кверцетина. При гидролизе разбавленными кислотами рутин дает кверцетин, глюкозу и рамнозу.

Принцип метода

Принцип определения заключается в том, что по весу кверцетина, образующегося при гидролизе рутина, определяют содержание последнего в препарате.

Применимость метода

Метод применим для анализа чистых препаратов рутина.

Аппаратура

1. Аналитические весы.
2. Разновесы.
3. Сушильный шкаф.
4. Электрическая плитка.

Посуда

1. Бюксы.
2. Колбы конические емкостью 200 мл.
3. Обратный холодильник.
4. Стеклянный фильтр № 3 или № 4.
5. Цилиндр мерный на 100 мл.

Реактивы

1. Дистиллированная вода.
2. 0,5% раствор соляной кислоты.

Ход анализа

Тщательно перемешанную среднюю пробу рутина помещают в бюкс. Для анализа берут две-три точные навески препарата (около 1 г каждая). Навеску переносят количественно в коническую колбу емкостью 200 мл, приливают 100 мл 0,5% раствора соляной кислоты и кипятят с обратным холодильником на электроплитке или на газовой горелке с сеткой в течение 30 минут. Раствору дают охладиться, после чего собирают количественно образовавшийся осадок на предварительно взвешенный стеклянный фильтр № 3 или № 4. Промывают 3—4 раза по 10 мл дистиллированной водой до достижения отсутствия реакции с раствором азотнокислого серебра на хлор-ион и высушивают при температуре 110° до постоянного веса.

Определяют также влажность рутина: 0,5 г препарата высушивают при температуре 135° до постоянного веса.

Вычисление результатов анализа

Содержание рутина вычисляют по следующей формуле, принимая, что 1 г безводного кверцетина соответствует 2,019 г безводного рутина:

$$x = \frac{a \cdot 100 \cdot 2{,}019 \cdot 100}{100 - x_1}, \qquad (58)$$

где x — содержание рутина в процентах в пересчете на сухое вещество, a — вес кверцетина в граммах; x_1 — влажность в процентах.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

НОРМЫ СУТОЧНОГО ПОТРЕБЛЕНИЯ ВИТАМИНОВ[1]

Для обеспечения населения питанием, содержащим витамины в количествах, предупреждающих гиповитаминозные состояния, вводятся нормы суточного потребления витаминов в соответствии с возрастными, физиологическими потребностями и профессиональными условиями. Эти нормы при составлении раскладок и меню суточного рациона должны рассматриваться как минимальные.

В случае невозможности обеспечить необходимое количество того или иного витамина за счет продуктов, входящих в рацион, недостающее количество должно быть восполнено за счет соответствующего витаминного препарата.

Для расчета содержания витаминов в рационе следует пользоваться нижеприводимой единой таблицей. Использование других данных, опубликованных в различных руководствах и справочниках, допускается только при отсутствии их в настоящей таблице.

Пояснение к таблице. Потребность человека в витамине А выражена в таблице следующими единицами измерения: 1) в интернациональных единицах (ИЕ); 2) в миллиграммах витамина А; 3) в миллиграммах каротина.

1 мг витамина А соответствует 3300 ИЕ, а 1 мг каротина (β-каротина) — 1660 ИЕ.

1 ИЕ витамина D соответствует 0,000025 мг химически чистого витамина D (кальциферола).

---

[1] Настоящие нормы суточного потребления витаминов разработаны специальными комиссиями Наркомздрава СССР в составе акад. А. В. Палладина, профессоров Б. А. Лаврова, С. Н. Мацко, Н. С. Ярусовой (Государственная контрольная витаминная станция), В. В. Ефремова, О. П. Молчановой, Л. А. Черкеса, кандидата биологических наук Б. И. Яновской (Центральный институт питания), проф. А. В. Рейслера (I Московский медицинский институт), акад. Г. Н. Сперанского (Педиатрический институт), проф. А. А. Шмидта (Витаминный институт Народного комиссариата пищевой промышленности СССР), проф. В. Н. Букина, проф. В. А. Энгельгардта (Академия наук СССР), подполковника К. С. Петровского (Главное военно-санитарное управление Красной Армии), т. Смирновой (Санитарное управление Военно-Морского флота), Г. Е. Гуровича (Управление снабжения войск НКВД), доцента В. А. Девятнина (Комитет растительных ресурсов) и др. Нормы утверждены Наркомздравом СССР 29 августа 1944 г.

Минимальная суточная потребность человека в витаминах[1]

	Витамины							
	A							D в ИЕ
	ИЕ	витамин A	каротин	B_1	B_2	C	PP	
	(в миллиграммах)							
1. Взрослый человек:								
а) при средней затрате труда	3 300	1	2	2	2	50	15	До 1 000
б) при тяжелом труде . .	3 300	1	2	2,5	2	75	20	
в) при очень тяжелом труде	3 300	1	2	3	2	100	25	
2. Беременные (5—8 месяцев)	6 600	2	4	2,5	2	75	20	500—1 000
3. Кормящие (до 7 месяцев) . .	8 300	2,5	5	3	2	100	25	500—1 000
4. Дети:								
а) до 7 лет . .	3 300	1	2	1	2	30—35	15	500—1 000
б) от 7 до 14 лет	3 300	1	2	1,5	2	50	15	500—1 000
в) свыше 14 лет	3 300	1	2	2	2	50	15	500—1 000

[1] Перепечатывается со второго издания „Норм". Медгиз, 1946.—Ред.

1 ИЕ А-витаминной активности соответствует активности 0,0006 мг каротина (β-каротина) или 0,0003 мг витамина А.

Витамин А до уровня 1,5 мг (или соответственно 3 мг каротина), около 5000 ИЕ, может быть доставлен потребителю в виде пищевых средств. Дополнительное снабжение, сверх 5000 ИЕ, должно быть осуществлено путем дачи соответствующих витаминных препаратов (каротина или витамина А). Препараты витаминов D и PP должны применяться по назначению врача[1].

[1] Всесоюзная государственная санитарная инспекция 23 января 1949 г. разрешила продажу драже с витамином D без рецептов врачей. Каждая упаковка препарата витамина D должна быть снабжена специальной этикеткой с обозначением количества драже (в штуках), разрешаемого на однократный и суточный прием, с отдельной дозировкой для детей и взрослых.

Приложение 2

ПОСТАНОВЛЕНИЕ ВСЕСОЮЗНОЙ ГОСУДАРСТВЕННОЙ САНИТАРНОЙ ИНСПЕКЦИИ № 6

Москва, 18/IV 1945 г.

Для упорядочения снабжения потребителей витаминной продукцией и обеспечения контроля ее качества Всесоюзная государственная санитарная инспекция постановляет:

1. Ввести с 1/VI 1945 г. однообразное этикетирование всей витаминной продукции, выпускаемой витаминными заводами в оригинальной упаковке.

2. Установить следующую форму этикетки:

а) название препарата;

б) вес или объем препарата;

в) содержание витамина в единице объема, веса, в одной таблетке, грануле и т. п. в миллиграммах или миллиграмм-процентах, или в интернациональных единицах (ИЕ);

Примечание. Обозначение витаминной ценности препарата в человеко-дозах не допускается.

г) рекомендация суточной дозы для взрослых не ниже минимальной дозы, приведенной в «Нормах суточного потребления витаминов», утвержденных Всесоюзной государственной санитарной инспекцией 29/VIII 1944 г.;

д) наименование завода, его местонахождение;

е) номер партии, дата изготовления, срок годности препарата;

ж) на этикетках витаминов PP (никотиновая кислота) и D четким шрифтом должно быть обозначено: «Отпускается только по рецепту врача» [1].

Приложение 3

ИНСТРУКЦИЯ [2] ПО ПРОВЕДЕНИЮ ГОСУДАРСТВЕННОГО ВИТАМИННОГО КОНТРОЛЯ

I. Общие положения

1. Организация государственного витаминного контроля за качеством всяких промышленных витаминных изделий и за содержанием витаминов в пище и продуктах питания возлагается на областные, краевые, городские, районные отделы здравоохранения и

---

[1] Всесоюзная государственная санитарная инспекция 23 января 1948 г. разрешила продажу драже с витамином D без рецептов врачей.

[2] Утверждена Министерством здравоохранения СССР 6 августа 1957 г. за № 254.

объединенные районные больницы. Главные врачи местных санитарно-эпидемиологических станций и заместители по санитарно-эпидемиологическим вопросам главного врача района обязываются возглавить работу по указанному контролю. Лабораторные исследования производятся лабораториями санитарно-эпидемиологических станций и объединенных районных больниц.

Объектом контроля являются:

а) этикетированные витаминные изделия и витаминные препараты, выпускаемые промышленными предприятиями, включая и витаминизированный рыбий жир;

б) витаминные изделия и витаминные препараты, находящиеся в аптечных и других торговых складах (базах) и в местах продажи населению (аптеки, магазины, ларьки и т. п.);

в) витаминизированные блюда в детских профилактических и санаторных учреждениях, больницах (для детей и взрослых) и родильных домах (в соответствии с приказом Министерства здравоохранения СССР от 13/IX 1955 г. за № 209-м), пионер-лагерях, столовых, обслуживающих учащихся учебных заведений трудовых резервов, и других объектах общественного питания, где производится витаминизация готовых блюд, а также витаминные препараты, применяемые для витаминизации блюд;

г) плодоовощные блюда в суточном рационе питания организованных коллективов на предприятиях общественного питания, где искусственная витаминизация готовой пищи не производится (контроль в течение всего года);

д) донорское женское молоко.

2. Методическое руководство по государственному витаминному контролю возлагается на Государственный институт витаминологии Министерства здравоохранения СССР.

Институтом составляются различные методические указания, разрабатываются для утверждения Министерством здравоохранения СССР проекты организационных мероприятий, имеющих отношение к государственному витаминному контролю, даются заключения о деятельности органов и учреждений санитарно-эпидемиологической службы СССР по линии осуществления ими государственного витаминного контроля, проводится необходимая консультация с выездом сотрудников института на места или методом переписки.

3. Отчетные материалы по государственному витаминному контролю представляются санитарно-эпидемиологическими станциями и заместителями по санитарно-эпидемиологическим вопросам главного врача района вышестоящей инстанции в установленные для общих отчетов о работе сроки. Санитарно-эпидемиологические управления министерств здравоохранения союзных республик представляют отчеты Главной государственной санитарной инспекции СССР один раз в год в установленный срок.

4. Государственному институту витаминологии поручается составление общей по Советскому Союзу сводки по государственному витаминному контролю один раз в год на основании отчетных материалов органов государственного санитарного надзора и собственных материалов по контролю.

5. Государственный институт витаминологии производит обучение витаминологическому анализу сотрудников санитарно-эпидемиологических станций и лабораторий объединенных районных боль-

ниц, командируемых в институт на рабочие места по предварительной договоренности с дирекцией института.

6. Государственный институт витаминологии производит контрольные лабораторные исследования образцов, изъятых институтом или учреждениями санитарно-эпидемиологической службы на местах производства или в торговой сети, а также доставленных институту другими организациями.

II. Порядок изъятия проб для лабораторного витаминного контроля

А. Порядок изъятия проб витаминных препаратов и изделий на месте их производства

1. Главным врачам санитарно-эпидемиологических станций, заместителям по санитарно-эпидемиологическим вопросам главного врача района устанавливается:

а) наличие промышленных предприятий, изготовляющих витаминные препараты и изделия на территории данного района;

б) ассортимент продукции на отдельном предприятии и частота выпуска партий каждого отдельного наименования;

в) соответствие торговых этикеток выпускаемой продукции требованиям Всесоюзной государственной санитарной инспекции согласно постановлению № 6 от 18/IV 1945 г. (а также соответствие ГОСТ или ВТУ на данный продукт);

г) квартальный план изъятия проб указанной продукции органами санитарного надзора для лабораторного контроля. При реализации этого плана следует учесть, что изъятие проб с данного промышленного предприятия не должно приурочиваться к определенной, заранее известной дате.

2. Выемка проб каждого вида витаминных препаратов и изделий со склада, экспедиции промышленного предприятия-изготовителя для лабораторного контроля производится не менее одной пробы в месяц каждого продукта, выпускаемого с данного предприятия, при выпуске не более одной партии в течение 3 дней. При более частом выпуске партий выемка проб производится из приблизительного расчета от каждой 10—15-й партии. Способы отбора проб и размер проб указаны в соответствующих ГОСТ или ВТУ (см. ниже).

3. Изъятые для анализа пробы помещаются в соответствующую тару[1], пломбируются, снабжаются этикеткой с указанием завода-изготовителя, номера партии, даты выпуска, содержания витаминов в продукте; к пробам прикладываются товарные образцы этих продуктов в практикуемой расфасовке, и пробы немедленно отправляются предприятием-изготовителем в лабораторию местных органов государственного санитарного надзора или в Государственный институт витаминологии (Москва, Г-117, Погодинская ул., 10) для анализа, с приложением акта изъятия проб.

Примечание. Для тех городов и районов, где витаминный контроль уже организован местной лабораторией государ-

[1] Пробы жидких продуктов должны помещаться в посуду из темного стекла и заполняться доверху.

ственного санитарного надзора, отправка проб в адрес Государственного института витаминологии должна производиться по договоренности руководства данной санитарно-эпидемиологической станции или объединенной районной больницы с дирекцией Государственного института витаминологии.

4. Кроме проб, предназначенных для лабораторного анализа, производится выемка параллельной пробы (в таком же количестве и с той же этикеткой, см. п. 3), каковая сохраняется в лаборатории предприятия вместе с копией акта изъятия проб в течение 6 месяцев со дня выработки продукта.

5. При изъятии проб для лабораторного контроля представитель государственного санитарного надзора составляет акт, в котором перечисляются названия изъятых препаратов и их число; указывается количество каждого (в граммах, миллилитрах); наименование предприятия-изготовителя, номер партии и дата выпуска продуктов, содержание витаминов в продуктах, дата изъятия пробы, кем произведено изъятие проб (фамилия лица, должность, учреждение), а также делается ссылка на то, что изъятие проб проведено в соответствии с данной инструкцией. Акт прилагается к сопроводительному письму при пересылке проб в лабораторию, производящую контрольный анализ.

Копия акта с сопроводительным письмом могут быть посланы и отдельно от посылки с изъятыми пробами, но в таком случае в посылку вкладывается официальная фактура с описанием пересылаемого материала и со ссылкой на номер сопроводительного письма.

Примечание. Содержание витаминов должно быть указано (на этикетке и в акте) или в обычных весовых единицах (граммы, миллиграммы), или в условных интернациональных единицах (ИЕ) на единицу объема или веса продукта, или на гранулу, таблетку и т. п. Обозначение витаминной ценности продукта в так называемых человеко-дозах **не допускается.**

6. Поступающие в лабораторию для анализа пробы продукта регистрируются в книге с указанием: даты поступления пробы, наименования продукта (содержание этикетки), количества его, его витаминной активности по этикетке, формы тары и упаковки, номера и даты сопроводительного письма, с которым поступает материал для анализа.

7. Витаминологический анализ присылаемых продуктов производится по прописям, установленным ГОСТ или ВТУ на данный продукт. Присланные препараты рекомендуется анализировать возможно быстрее, но не позднее чем через 2 недели после их поступления в лабораторию.

8. Остатки анализированных проб хранятся в лаборатории не менее месяца для проведения в случае надобности повторного анализа.

9. Результаты анализа излагаются в документе, исходящем из лаборатории или учреждения, производившего анализ, с указанием номера и даты сопроводительного письма, при котором была представлена продукция для анализа, величины присланной пробы, формы упаковки, витаминной активности продукта по этикетке и по анализу в установленных единицах и заключения о соответ-

ствии качеств данного продукта требованиям ГОСТ или ВТУ и показателям этикетки, причем указывается процент расхождения в содержании витаминов с данными этикетки. С другой стороны, должно быть обращено внимание на соответствие текста торговой (оригинальной) этикетки требованиям ГОСТ (ВТУ) и постановлению ВГСИ от 18/IV 1945 г.

10. Данные анализа, изложенные в форме, указанной в п. 9, передаются руководству санитарно-эпидемиологической станции или объединенной районной больницы, осуществляющей надзор за предприятием, откуда поступили образцы, а в копии — руководству предприятия-изготовителя.

11. Сводные данные о случаях отклонения в содержании витаминов в препаратах от указанного на этикетке, **превышающего** допуск, установленный ГОСТ или ВТУ для данного продукта, санитарно-эпидемиологическими станциями и СЭУ министерства здравоохранения союзных республик включаются в представляемые вышестоящей инстанции отчеты (согласно § 3 раздел 1). На основании этих данных, а также собственных данных, Государственный институт витаминологии составляет общую годовую сводку об отклонениях по Советскому Союзу и сообщает ее Главной государственной санитарной инспекции СССР и руководству витаминной промышленностью. В сводках указывается, сколько было получено проб данного наименования в лаборатории с каждого завода-изготовителя и какое количество таковых проб показало нарушение установленного допуска.

12. Способы отбора проб витаминных **драже, таблеток и порошков:**

а) при расфасовке в пробирки, банки, коробки и флаконы отбирают 10% всех тарных мест, но не менее трех мест и из каждого отобранного тарного места берут такое количество пробирок, банок, флаконов или коробок, чтобы общий вес пробы составлял не менее 600 г.

Отобранные единицы расфасовки с порошком, таблетками и драже вскрывают после оценки внешнего вида и проверки укупорки и выделяют среднюю пробу следующим образом: содержимое коробок, банок, флаконов и пробирок высыпают в отдельную чистую, сухую банку, тщательно перемешивают и выделяют среднюю пробу в количестве 400 г;

б) при расфасовке в барабаны, бочонки, картонную или бумажную литую тару отбирают 10% всех упаковочных мест, но не менее трех мест.

Затем из разных мест барабана, бочонка, картонной и бумажной литой тары отбирают по 100—200 г продукта в отдельную чистую сухую банку и после тщательного перемешивания выделяют среднюю пробу в количестве 400 г.

Примечание 1. При наличии в одной партии пробирок, банок, барабанов и т. д. выделенные для каждого вида упаковки пробы соединяют и затем, после тщательного перемешивания, выделяют среднюю пробу в количестве 400 г.

Примечание 2. Пробу поливитаминного драже отбирают в количестве 600 г.

13. Способы отбора проб **кристаллических витаминных препаратов:**

а) при расфасовке в пробирки, банки, коробки и флаконы отбирают 10% всех тарных мест, но не менее трех, и из каждого отобранного тарного места, в зависимости от величины партии, берут от одной до трех пробирок или по одному флакону, банке и коробке. Отобранные пробирки, флаконы, коробки или банки вскрывают, содержимое их помещают в чистую, сухую банку, тщательно перемешивают и выделяют среднюю пробу в количестве от 20 до 100 г;

б) при расфасовке в барабаны или коробки из разных (но не менее трех) мест барабана или коробки отбирают 200 г продукта в отдельную чистую, сухую банку и после тщательного перемешивания выделяют среднюю пробу в количестве от 20 до 100 г.

14. Способы отбора проб жидких витаминных препаратов:

а) при расфасовке во флаконы емкостью до 50 мл включительно отбирают 4% всех тарных мест, но не менее трех;

б) при расфасовке во флаконы и бутылки емкостью свыше 50 мл отбирают 5% всех тарных мест, но не менее трех.

Из отобранных тарных мест выделяют пробу:

при расфасовке во флаконы емкостью до 50 мл включительно — не менее 300 мл от всех отобранных тарных мест;

при расфасовке во флаконы, банки, коробки и бутылки емкостью свыше 50 мл — по одному флакону, банке, коробке или по одной бутылке от каждого отобранного тарного места;

в) при расфасовке в бочки, бидоны, цилиндры (барабаны) и стеклянные банки (емкостью свыше 3 л) отбирают 10% всех тарных мест, но не менее трех.

Среднюю пробу выделяют следующим образом: содержимое отдельных флаконов выливают в отдельную чистую, сухую банку и затем, после тщательного перемешивания, отбирают среднюю пробу в плотно закрывающуюся склянку в количестве 200 мл.

Из отобранных флаконов, бутылок и банок емкостью свыше 50 мл, после тщательного перемешивания их содержимого, отливают по 50 мл в отдельную чистую, сухую банку, из которой после тщательного перемешивания отбирают среднюю пробу в количестве 200 мл в плотно закрывающуюся склянку.

Примечание. При наличии в одной партии флаконов, банок и бутылок выделенные для каждого вида упаковки пробы соединяют и затем, после тщательного перемешивания, выделяют среднюю пробу в количестве 200 мл.

г) Из бочек, бидонов, цилиндров (барабанов) и стеклянных баллонов пробы отбирают при помощи стеклянной трубки или сифона после тщательного перемешивания; жидкости выливают в отдельную чистую, сухую склянку в количестве от 50 до 100 мл.

Содержимое склянки тщательно перемешивают и из нее отбирают среднюю пробу в количестве 200 мл в хорошо закрывающуюся склянку.

15. Способы отбора проб **жидких витаминных препаратов в ампулах:**

отбирают 10% всех тарных мест, но не менее трех мест; из каждого отобранного места отбирают такое количество ампул, чтобы общий объем их содержимого составлял не менее 200 мл.

16. Отобранную согласно п. п. 12, 13 и 14 среднюю пробу делят пополам: одна часть предназначается для отправки на анализ,

другая часть хранится в лаборатории завода в течение времени, предусмотренного сроком хранения данного препарата, но не более 6 месяцев.

Обе пробы помещают в чистые, сухие склянки, герметически укупоривают, опечатывают смолкой или сургучом с оттиском печати завода и снабжают этикеткой согласно п. 3 этого раздела. Пробы пломбируются, кроме того, пломбиром санитарно-эпидемиологической станции или районной больницы.

Примечание. Способы отбора проб, изложенные в п.п. 12—15, соответствуют требованию ГОСТ 7047-55.

Отбор проб на продукты, не предусмотренные этим ГОСТ, производится в соответствии с действующими стандартами и ВТУ на данные продукты.

Б. Порядок изъятия образцов витаминных препаратов и изделий, находящихся в аптечных и других складах (базах) и в местах ручной продажи населению (в аптеках, магазинах, ларьках и т. п.)

1. Санитарно-эпидемиологические станции и объединенные районные больницы организуют проверку витаминных препаратов и изделий, предназначенных для продажи населению и находящихся в торговой сети (в аптеках, аптечных киосках, диетических и прочих магазинах, где производится торговля витаминными препаратами и изделиями), а также в соответствующих складах и базах с целью установления соответствия содержания витаминов в препаратах указанному на этикетке и выявления партий упомянутых продуктов с **истекшим сроком хранения.**

2. При обнаружении витаминных продуктов с истекшим сроком хранения представитель санитарного надзора временно запрещает их реализацию и вместе с тем уведомляется та санитарно-эпидемиологическая станция или районная больница, на территории которой находится центральный склад или база, снабжающая витаминными препаратами данную торговую точку. Эта санитарно-эпидемиологическая станция в свою очередь предъявляет центральному складу или базе требование об изъятии из торговой сети витаминных продуктов с истекшим сроком хранения. По установлению количества таковых продуктов представителем санитарного надзора отбираются пробы для отсылки их на лабораторный контроль (в местную лабораторию или в Государственный институт витаминологии). До получения данных по контролю на товары с истекшим сроком хранения реализация их запрещается.

3. Если по заключению лаборатории качество задержанных витаминных препаратов или изделий соответствует существующим ГОСТ или ВТУ, местный орган государственного санитарного надзора снимает запрет и дает продление срока хранения и продажи на один срок (для ампульных препаратов на 1/2 срока), предусмотренный соответствующим ГОСТ или ВТУ.

4. По истечении продолженных сроков хранения препараты изымаются из торговой сети.

Вопрос о возможности и условиях реализации в порядке исключения витаминных препаратов с пониженным содержанием витамина против указанного на этикетке решается в каждом кон-

кретном случае органами государственного санитарного надзора в зависимости от конкретных обстоятельств.

5. Способы отбора проб см. раздел А.

В. Порядок изъятия проб витаминизированных блюд на предприятиях общественного питания

1. Лабораторный контроль за витаминизацией блюд (первых или третьих) или продуктов (молока и кефира) в детских учреждениях, больницах и родильных домах, где введена таковая витаминизация как обязательная (приказ министра здравоохранения СССР № 209-м от 13/IX 1955 г.), а также в пионерлагерях, столовых, обслуживающих учащихся учебных заведений трудовых резервов, и других предприятиях общественного питания, где производится витаминизация готовой пищи, возлагается на местные санитарно-эпидемиологические станции и объединенные районные больницы.

2. Для осуществления такого контроля санитарно-эпидемиологическая станция или объединенная районная больница устанавливает список и дислокацию упомянутых учреждений и составляет квартальный план изъятия проб, руководствуясь подпунктом «г» п. 1 раздела А настоящей инструкции.

Частота лабораторного контроля за содержанием аскорбиновой кислоты в витаминизированных блюдах (или продуктах) планируется в зависимости от практических возможностей лаборатории; рекомендуется осуществлять его для каждого учреждения не реже двух раз в месяц.

3. Контрольному анализу подлежат все витаминизированные блюда (или продукты), входящие в этот день в меню данного учреждения: первые или третьи блюда, молоко или кефир.

4. Блюда для анализа должны браться в стеклянную посуду с крышкой, выстланной пергаментной бумагой. Витаминизированное молоко берется в посуду из темного стекла, или посуда закрывается темной бумагой, или она тотчас по наливании в нее молока помещается в темную тару.

5. Витаминизированные блюда берутся представителем санитарно-эпидемиологической станции или районной больницы в момент подачи их в питание детям, кормящим матерям, больным и др.

6. Лицо, ответственное за осуществление витаминизации (старшая медицинская сестра или диетсестра в больницах, родильных домах и санаториях и старшая или групповая сестра-воспитательница в яслях и домах ребенка, выделенный санитарный работник, шеф-повар, зав. столовой), передает представителю санитарно-эпидемиологической станции данные записи в специальной тетради (см. ниже п. 11) для внесения этих данных в акт выемки пробы. Кроме того, в акте помечается наименование контролируемого учреждения, время взятия проб и другие данные (см. ниже п. 11). При взятии пробы блюда для анализа представитель санитарно-эпидемиологической станции обязан проверить по представленной ему в учреждении записи правильность вложения аскорбиновой кислоты в блюдо и дать разъяснение в случае обнаруженного дефекта в документации или в способах витаминизации.

7. Время (дата, час, минуты — последние с округлением) начала анализа блюда (продукта) в лаборатории санитарно-эпиде-

миологической станции или объединенной районной больницы фиксируется производящим анализ лицом. Промежуток времени, протекающий между моментом витаминизации блюда (продукта) и началом анализов, не должен превышать 1—1½ часов (для кефира и молока — 3 часов).

8. Санитарно-эпидемиологические станции в случаях отклонений данных анализа от ожидаемого содержания аскорбиновой кислоты в порции более чем на ±15% **немедленно** сообщают об этом в райздравотдел или главному врачу района и руководителю учреждения, в котором взяты пробы, для принятия ими соответствующих мер.

Примечание. Аскорбиновая кислота вводится в блюда из расчета 35 мг для детей до 7 лет, 50 мг для детей 7 лет и старше и 100 мг для взрослых (в больницах и родильных домах).

9. Анализ витаминизированных блюд на содержание витамина С производится по упрощенному стандартному методу, изложенному в методическом руководстве по определению витаминов (Медгиз, II издание, 1950, стр. 59—61), а анализ витаминизированного молока производится по методу, описанному там же, стр. 66—68, в ГОСТ 7047-55, § 14, «р» и «с»).

Примечание. При анализе кефира берется навеска 50 г, добавляется 150 мл 2% раствора соляной кислоты, все растирается при помешивании и настаивается 10 минут; после фильтрования смеси (через вату) или ее центрифугирования для титрования употребляется до 10 мл фильтрата или центрифугата (в зависимости от содержания в нем витамина С). Анализ молока и кефира производится после анализа первых и третьих блюд.

10. Все работники санитарно-эпидемиологических станций и районных больниц, связанные с контролем за витаминизацией, получают соответствующий инструктаж у главного врача санитарно-эпидемиологической станции или заместителя по санитарно-эпидемиологическим вопросам главного врача района и обязаны хорошо знать инструкцию по проведению С-витаминизации, приложенную к приказу министра здравоохранения № 209-м от 13/IX 1955 г.

Работа по проведению лабораторного контроля за витаминизацией пищи должна освещаться в отчетах, представляемых согласно п. 3 раздела I.

В отчетных материалах должно быть указано: 1) количество учреждений, в которых должна проводиться витаминизация питания; 2) в скольких учреждениях витаминизация питания производилась фактически; 3) сколько из этих учреждений было обследовано; 4) средняя повторность обследования учреждений за отчетный период; 5) число анализов блюд (по профилактическим и лечебным учреждениям отдельно), в которых содержание витамина С соответствует норме; число анализов блюд, в которых содержание витамина отклоняется от нормы в сторону плюса или минуса, отдельно.

11. В тех случаях, когда местная санитарно-эпидемиологическая станция не располагает возможностями производить лабораторное исследование витаминизированных блюд, в частности из-за даль-

ности расстояния, контроль за витаминизацией ограничивается тем, что представитель санитарного надзора, который производит проверку записей, документирующих витаминизацию в данном учреждении, требует от лица, ответственного за витаминизацию (см. выше, п. 6), тетрадь, разграфленную на каждый день месяца, где должно быть занесено: а) наименование витаминизированного блюда, б) число витаминизированных порций, в) количество аскорбиновой кислоты (в миллиграммах), введенной в общую массу блюда, г) расход таблеток, использованных для витаминизации, д) время витаминизации — число, час, минуты.

Представитель государственного санитарного надзора должен удостовериться в правильности расчетов и в случае наличия ошибок дать соответствующие указания.

Г. Порядок изъятия проб невитаминизированных готовых блюд в предприятиях общественного питания организованных коллективов

1. В предприятиях общественного питания, снабжающих организованные коллективы круглосуточным питанием, где искусственная витаминизация не производится, санитарно-эпидемиологические станции, однако, должны собирать материал, характеризующий С-витаминное качество питания в данных учреждениях.

2. Для исследования С-витаминного качества питания следует отбирать для лабораторного анализа из суточных рационов только блюда (или гарниры) из овощей и плодов, содержащих в естественном состоянии витамин С. Забор блюд производится при подаче блюд потребителю в присутствии ответственных представителей администрации.

3. При взятии проб составляется документ с указанием даты, наименования предприятия, его адреса, названия блюда, раскладки и выхода блюда, времени забора проб.

4. Анализ блюда должен производиться не позднее 1 часа после забора пробы.

5. Анализ блюд на аскорбиновую кислоту производится по ГОСТ 7047-55.

6. Результаты анализа отмечаются в книге лаборатории со следующими графами: № п/п, наименование предприятия, откуда поступила проба блюд, название блюда, вес порции в граммах, содержание аскорбиновой кислоты в миллиграммах на порцию, суммарное содержание витамина С в суточном рационе.

7. О результатах анализа блюд и подсчетах аскорбиновой кислоты в суточном рационе лаборатория сообщает своему руководству для уведомления контролируемого предприятия. В случае несоответствия содержания витамина С в суточном рационе с гигиенической нормой, местный государственный санитарный надзор предлагает руководству предприятия провести конкретные мероприятия с целью обогащения витамином С блюд в суточном рационе [минимальная гигиеническая (физиологическая) доза витамина С должна быть 50 мг в день для взрослых и детей от 7 лет и 35 мг для детей до 7 лет].

8. Повторность исследования суточных рационов для каждого контролируемого учреждения не должна быть менее трех раз в квартал.

9. Данные об анализах суточных рационов в питании организованных коллективов вводятся в отчеты санитарно-эпидемиологической станции и объединенных районных больниц о работе, представляемых согласно п. 3 раздела I с указанием, какие меры приняты санитарно-эпидемиологической станцией в случаях неудовлетворительного С-витаминного качества исследованных суточных рационов.

Д. Порядок изъятия проб у доноров женского молока в донорских пунктах, в домах ребенка и в других учреждениях

1. Для исследования содержания витамина С в молоке молочных доноров пробы молока берутся в количестве 10—15 мл в стеклянную посуду с хорошо подобранной пробкой (резиновой).

2. Посуда с пробой номеруется и ставится в темную тару (ящик) для перенесения в лабораторию.

3. О взятии пробы составляется документ с указанием, из какого учреждения взята проба, от каких лиц (фамилия), какие номера проб относятся к каждому из этих лиц, время взятия пробы.

4. Анализ женского молока производится в лаборатории по методу, указанному в Методическом руководстве по определению витаминов (Медгиз, М., 1950, 2-е изд., стр. 66—68). Срок производства анализа — не позднее 2—3 часов после взятия проб.

5. Результаты анализа должны быть отмечены в книге по контролю за витаминным качеством пищевых продуктов и питания населения с указанием даты, наименования учреждения, места взятия пробы, фамилий доноров, срока анализа после взятия пробы, содержания аскорбиновой кислоты в миллиграмм-процентах.

6. Результаты анализа с заключением руководства санитарно-эпидемиологической станции или заместителя по санитарно-эпидемиологическим вопросам главного врача района должны быть переданы в контролируемое учреждение в целях предъявления требований о С-витаминизации доноров в случае нахождения аскорбиновой кислоты в молоке ниже 5 мг%.

7. Данные о проведенных исследованиях женского молока на его С-витаминное качество сообщаются в отчетах о деятельности санитарно-эпидемиологических станций и объединенных районных больниц, представляемых согласно п. 3 раздела I с указанием мест взятия проб и мероприятий, предпринятых для повышения С-витаминного качества женского молока в случаях, где это качество ниже упомянутого в п. 6.

С введением в действие настоящей инструкции «Инструкция о порядке проведения контроля за качеством витаминных препаратов, содержанием витаминов в натуральных пищевых продуктах, консервах, кулинарных изделиях и сцеженном женском молоке», утвержденная главным госсанинспектором СССР 14 марта 1950 г., и «Инструкция о порядке изъятия проб витаминных препаратов и изделий для контрольного анализа в лабораториях санитарно-эпидемиологических станций и в Государственной контрольно-витаминной станции Министерства здравоохранения СССР», утвержденная главным госсанинспектором СССР 27 декабря 1950 г., отменяются.

Приложение 4

ПРИКАЗ
МИНИСТРА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

г. Москва № 209-м 13/IX 1955 г.

Об обязательной витаминизации питания в детских учреждениях, больницах (для детей и взрослых) и родильных домах

Проведенное органами санитарно-эпидемиологической службы и Государственным научно-исследовательским институтом витаминологии изучение витаминного качества питания в детских учреждениях и стационарах больниц показало низкое содержание витамина С в рационах питания, особенно в зимне-весенний период года.

Учитывая, что содержание аскорбиновой кислоты в ежедневном питании имеет большое значение для правильного развития ребенка, а также повышает сопротивляемость организма к заболеваниям, ПРИКАЗЫВАЮ:

I. Министрам здравоохранения союзных и автономных республик, заведующим краевыми, областными, городскими и районными отделами здравоохранения:

1. Ввести с 1 января 1956 г. обязательную витаминизацию готовой пищи в детских яслях, домах ребенка, детских санаториях, больницах и родильных домах гигиенической дозой витамина С.

2. Возложить на руководителей детских яслей, домов ребенка, детских санаториев, больниц и родильных домов персональную ответственность за точное выполнение инструкции по проведению С-витаминизации готовой пищи (приложение).

3. Руководство и контроль за проведением этого мероприятия возложить на областные, краевые, городские и районные отделы здравоохранения.

4. Оплату стоимости синтетической аскорбиновой кислоты для целей витаминизации пищи производить по ст. 9 «Питание».

5. Лабораторный контроль за проведением С-витаминизации готовой пищи возложить на органы санитарно-эпидемиологической службы.

II. Начальнику главного аптечного управления М. А. Клюеву обеспечить выделение необходимого количества аскорбиновой кислоты по союзным республикам, согласно заявкам министров здравоохранения этих республик.

III. Общее методическое руководство в проведении витаминизации пищи в детских и лечебных учреждениях возложить на Государственный научно-исследовательский институт витаминологии (директор — проф. Б. А. Лавров).

IV. Контроль за выполнением настоящего приказа возложить на заместителя главного госсанинспектора СССР Ю. Д. Лебедева.

Министр здравоохранения СССР М. Д. Ковригина.

Приложение 5

ИНСТРУКЦИЯ[1] ПО ПРОВЕДЕНИЮ С-ВИТАМИНИЗАЦИИ ПИТАНИЯ В БОЛЬНИЦАХ (ДЛЯ ДЕТЕЙ И ВЗРОСЛЫХ), ЯСЛЯХ, ДОМАХ РЕБЕНКА, ДЕТСКИХ САНАТОРИЯХ И РОДИЛЬНЫХ ДОМАХ

Раздел I

1. В целях обеспечения питания в больницах (для детей и взрослых), яслях, домах ребенка, детских санаториях и родильных домах (родильных отделениях общих больниц) гигиенической дозой витамина С следует применять витаминизацию рационов питания синтетической аскорбиновой кислотой (медицинской).

Ежедневно витаминизируется только первое или третье блюдо обеда, кефир или молоко.

2. Аскорбиновая кислота вводится в виде таблеток в первые или третьи блюда из расчета: 35 мг для детей до 7 лет, 50 мг для детей свыше 7 лет и 100 мг для взрослых (в больницах).

Примечание. Таблетки могут быть выпущены с различным содержанием аскорбиновой кислоты, указанным на этикетке; этим указанием следует руководствоваться при использовании таблеток.

3. Витаминизация блюда из вышеприведенного расчета (п. 2), а также молока и кефира производится в больницах, родильных домах и санаториях старшей медицинской сестрой или диетсестрой, в яслях и домах ребенка — старшей или групповой сестрой.

4. Витаминизация готовых блюд должна производиться непосредственно перед их раздачей. Подогрев витаминизированных блюд не допускается.

Если необходимо произвести подогрев блюда, то витаминизация блюда производится после подогрева.

5. Способ витаминизации первых блюд: таблетки аскорбиновой кислоты, рассчитанные по количеству порций, кладутся в чистую тарелку, куда заранее налито небольшое количество (100—200 мл) жидкой части блюда, подлежащего витаминизации, и растворяются при помешивании ложкой. Для ускорения растворения таблеток их следует раздавливать в тарелке ложкой. Размешанный раствор таблеток аскорбиновой кислоты выливают в общую массу блюда, а тарелку ополаскивают (3 раза) отлитой заранее в другую тарелку жидкой частью этого блюда; жидкость сливают также в общую массу блюда.

После внесения раствора аскорбиновой кислоты блюдо тщательно перемешивают половником.

6. Витаминизированные блюда должны поступать в питание немедленно после их витаминизации.

7. Способ витаминизации третьих блюд (компоты и чай) аналогичен описанному в п. 5.

---

[1] Утверждено Министерством здравоохранения СССР 12/IX 1955 г. за № 195-55.

8. В учреждении, в отделении, в группе, где непосредственно производится витаминизация, должна быть заведена специальная разграфленная на каждый день месяца тетрадь, в которую лицом, ответственным за С-витаминизацию, ежедневно заносятся следующие сведения:

а) наименование витаминизированного блюда (суп, молоко, кефир, компот и др.);

б) число витаминизированных порций;

в) количество аскорбиновой кислоты (в миллиграммах), введенной в общую массу блюда;

г) время витаминизации — число, месяц, час, минуты.

При взятии пробы представителем санитарно-эпидемиологической станции эти же сведения вносятся в акт выемки пробы, составляемой лицом, отбирающим пробу.

9. Таблетки аскорбиновой кислоты, используемые для витаминизации блюд, молока и кефира, следует хранить у ответственного лица учреждения запертыми (в плотно закрытой пробкой посуде в темном, сухом и прохладном месте).

Раздел II

1. Для С-витаминизации детей ясельного возраста рекомендуется употреблять обогащенное аскорбиновой кислотой молоко или кефир. Грудные дети получают витаминизированное питание только с момента начала их прикорма; до получения прикорма витаминизируется мать или доноры женского молока:

а) Витаминизация кефира. Коровье молоко, предназначенное для изготовления кефира, должно витаминизироваться аскорбиновой кислотой (в виде таблеток) из расчета 175 мг аскорбиновой кислоты на 1 л молока.

Определенное количество таблеток раздробляют до состояния грубого порошка и постепенно при постоянном помешивании ложкой вводят в обогащаемое молоко. После окончания обогащения молока из него приготавливают кефир.

б) Витаминизация коровьего молока, употребляемого в пищу в натуральном виде, производится таким же образом, как описано выше, с расчетом, чтобы на порцию молока для ребенка до 7 лет приходилось 35 мг аскорбиновой кислоты. Для детей старше 7 лет таблетки аскорбиновой кислоты вводятся в молоко из расчета 50 мг на ребенка.

2. Аскорбиновую кислоту вводят непосредственно перед закипанием молока.

Следует стремиться к тому, чтобы витаминизированное молоко хранилось до употребления минимальное время.

При длительном хранении молока (до 15 часов после витаминизации) следует прибегать к холоду и оберегать молоко от действия света.

Раздел III

1. Инструктаж персонала лечебно-профилактических учреждений и родильных домов по С-витаминизации проводится горрайздравотделами, которые осуществляют также систематическое руководство и надзор за проведением витаминизации.

2. Лабораторный контроль за содержанием витамина С в витаминизированных блюдах производится местными санитарно-эпидемиологическими станциями.

3. Лабораторный контроль за содержанием аскорбиновой кислоты в витаминизированных блюдах рекомендуется осуществлять для каждого учреждения не реже двух раз в месяц.

4. Контрольному анализу подлежат все витаминизированные блюда, входящие в этот день в рацион данного учреждения: первые или третьи блюда, молоко или кефир.

5. Блюда для анализа должны браться в стеклянную посуду с крышкой, выстланной пергаментной бумагой. Витаминизированное молоко берется в посуду из темного стекла или посуда закрывается темной бумагой, или тотчас по наливании в нее молока помещается в темную тару.

6. Витаминизированные блюда берутся представителем санитарно-эпидемиологической станции в момент подачи их в питание детям, кормящим матерям, больным.

7. Лицо, ответственное за осуществление витаминизации (старшая и групповая сестра), передает представителю санитарно-эпидемиологической станции данные записи в специальной тетради (согласно разделу I п. 8 инструкции) для внесения этих данных в акт выемки пробы. При взятии пробы блюда для анализа представитель санитарно-эпидемиологической станции обязан проверить по представленной ему в учреждении записи правильность вложения аскорбиновой кислоты в блюдо и дать разъяснение в случае обнаруженного дефекта.

8. Указанные работники санитарно-эпидемиологических станций (помощники санитарного врача, лаборанты) получают соответствующий инструктаж у главного врача санитарно-эпидемиологической станции и обязаны хорошо знать инструкцию по проведению витаминизации.

9. Время (дата, час, минуты) начала анализа блюда на санитарно-эпидемиологической станции записывается лицом, анализирующим блюдо.

10. Санитарно-эпидемиологические станции в случаях отклонений данных анализа от ожидаемого содержания аскорбиновой кислоты в порции (см. раздел I, § 2) немедленно сообщают об этом заведующему горрайздравотделом и руководителю учреждения, в котором взяты пробы.

Работа по проведению лабораторного контроля за витаминизацией пищи должна освещаться в отчетах о работе, представляемых органами санитарно-эпидемиологической службы, вышестоящей инстанции, а санитарно-эпидемиологическими управлениями союзных республик — в отчетах, представляемых Министерству здравоохранения СССР.

11. Анализ витаминизированных блюд на содержание витамина С производится по упрощенному стандартному методу, изложенному в Методическом руководстве по определению витаминов (Медгиз, II издание, 1950 г., стр. 59—61).

12. Определение витамина С в витаминизированном молоке и кефире производится по методу, описанному в том же руководстве на стр. 66—68.

Примечание. При анализе кефира берется навеска 50 г, добавляется 150 мл 2% раствора соляной кислоты, все расти-

рается при помешивании и настаивается 10 минут; после фильтрования смеси через вату или ее центрифугирования для титрования употребляется до 10 мл фильтрата или центрифугата (в зависимости от содержания в нем витамина С).

13. Анализ молока и кефира производится после анализа первых и третьих блюд.

Раздел IV

В целях повышения биологических качеств женского молока в родовспомогательных учреждениях вводится дополнительная С-витаминизация женщин посредством ежедневной дачи им препарата аскорбиновой кислоты внутрь в дозе 250 мг в течение всего периода пребывания в родильном доме.

СОДЕРЖАНИЕ

Определение витамина А. *З. С. Графская* 3
Определение витамина А в жирах рыб и млекопитающих (натуральных и витаминизированных) 8
Определение витамина А в высокоактивных концентратах 9
Определение витамина А в драже с витамином А и поливитамином 9
Определение витамина А в витаминизированных пищевых продуктах (конфеты, печенье, пряники и т. д.) 10
Определение витамина А в сливочном и топленом масле, а также в витаминизированных жирах (маргарин, лярд и растительные масла) 10
Определение витамина А в тканях, органах и т. п. . . . 11
Определение витамина А в яйцах 11
Определение витамина А в коровьем молоке 12
Определение витамина А в женском молоке 13
Определение витамина А прибором З. С. Графской . . . 13
Определение витамина А электрофотоколориметром ФЭК-М 16
Определение каротина (провитамина А). *З. С. Графская* 19
Определение каротина в свежем растительном материале (свежие травы, овощи, плоды и ягоды) 24
Определение каротина в сухом растительном материале . 27
Определение каротина в плодоовощных консервах . . . 27
Определение каротина в растительных соках 28
Определение каротина в масляных концентратах 28
Определение каротина в жирах и маслах 29
Определение каротина в коровьем молоке и каротиноидов в женском молоке 29
Определение каротина в кристаллических препаратах . . 29
Определение каротина колориметром Дюбоска 30
Определение каротина электрофотоколориметром или ступенчатым фотометром 31
Определение каротина прибором З. С. Графской . . 32
Определение витамина А и каротина в пищевых продуктах. *З. С. Графская* 34
Определение витамина А и каротина в готовых блюдах. *З. С. Графская* 37
Определение витамина А и каротина в первых блюдах 37
Определение витамина А и каротина во вторых блюдах 40
Определение витамина D_2 химическим методом. *З. С. Графская* 42
Определение витамина D_2 в высокоактивных спиртовых концентратах 43

Определение витамина D_2 в масляных концентратах . 44
Определение витамина D_2 ступенчатым фотометром типа Пульфриха 45
Определение витамина D_2 электрофотоколориметром ФЭК-М 47
Определение витамина D_2 биологическим методом. *А. А. Лапина* 49
Определение витамина Е химическим методом. *З. С. Графская* 53
Определение витамина Е в спирто-сахарных и масляных препаратах 54
Определение витамина Е фотометром Пульфриха . 56
Тиохромный метод определения витамина B_1 (тиамина). *Е. И. Соловьева* 58
Флюорометрический метод определения тиамина в препаратах 62
Определение витамина B_1 в объектах, богатых связанной формой тиамина 65
Определение витамина B_1 в объектах, содержащих флуоресцирующие примеси 68
Флюороскопический метод определения тиамина в препаратах и пищевых продуктах 71
Методы определения витамина B_2 (рибофлавина). *В. П. Трофимович* 75
Флюорометрический метод определения рибофлавина в препаратах 75
Флюороскопический метод определения рибофлавина в препаратах 78
Колориметрический метод определения рибофлавина в кристаллическом препарате и драже с витамином B_2 . 81
Флюорометрический метод определения рибофлавина в пищевых продуктах и других объектах 84
Определение витамина B_6 (гидрохлоридпиридоксина) в чистых препаратах. *Н. А. Брюханова* 89
Анализ кристаллического препарата гидрохлоридпиридоксина 90
Анализ растворов гидрохлоридпиридоксина в ампулах 91
Методы определения витамина PP в препаратах. *В. П. Трофимович* 92
Объемный метод определения никотиновой кислоты в кристаллическом препарате, драже и таблетках . . . 92
Родан-бромидный метод определения никотиновой кислоты и никотинамида в кристаллическом препарате, драже и таблетках 95
Методы определения витамина С (аскорбиновой кислоты). *Н. С. Ярусова, В. А. Богданова, Н. Н. Березовская, Н. А. Брюханова, К. М. Тикоцкая, В. М. Селиванова* 99
Точный (арбитражный) метод определения аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом без применения сероводорода 101
Точный (арбитражный) метод определения аскорбиновой кислоты с 2,6-дихлорфенолиндофенолом с применением сероводорода 114

Особенности анализа некоторых объектов при применении арбитражных методов 118
Упрощенный (контрольный) метод определения витамина С 122
Хлороформный (контрольный) метод определения витамина С 130
Йодатный (контрольный) метод определения витамина С 133
Йодатный метод определения синтетической аскорбиновой кислоты 136
Йодометрический метод определения синтетической аскорбиновой кислоты 138
Определение аскорбиновой кислоты в ее ампульных препаратах 140
Применимость различных методов определения витамина С в различных объектах 143
Методы определения витамина Р. *К. М. Тикоцкая, Н. Н. Березовская* 146
Определение витамина Р (катехинов) в препаратах из чайного листа 146
Определение витамина Р (рутина) в чистых препаратах 151

Приложения 154

Нормы суточного потребления витаминов 154
Постановление Всесоюзной государственной санитарной инспекции № 6 от 18/IV 1945 г. 156
Инструкция по проведению государственного витаминного контроля № 254 от 6/VIII 1957 г. 156
Приказ министра здравоохранения СССР № 209-м от 13/IX 1955 г. Об обязательной витаминизации питания в детских учреждениях, больницах (для детей и взрослых) и родильных домах 167
Инструкция по проведению С-витаминизации питания в больницах (для детей и взрослых), яслях, домах ребенка, детских санаториях и родильных домах 168

Редактор *Г. И. Бондарев*
Техн. редактор *Н. А. Бульдяев*
Корректор *Л. С. Верещагина*
Переплет художника *В. С. Сергеевой*

Сдано в набор 1/XII—1959 г. Подписано к печати 12/III—1960 г. Формат бумаги $84 \times 108^1/_{32}$. = 5,5 печ. л. +0,13 печ. л. вкл. (условных 9,22 л.) 8,72 уч.-изд. л. Тираж 8000 экз. Т-02084 МН-53.

Медгиз, Москва, Петровка, 12
Смоленск, типография имени Смирнова
Заказ № 5008
Цена 4 р. 40 к. Переплет 1 р.

55

580 -

5 р. 40 к.

С 1. 1. 1961 года
Цена — р. 54 к.